



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΤΖΙΟΡΤΖΙΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ
ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΜΟΡΙΩΝ»**

**“INVESTIGATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF
PLANT DERIVED MOLECULES”**

«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΜΟΡΙΩΝ»

ΤΖΙΟΡΤΖΙΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΟΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΛΛΙΟΠΗ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

ΨΑΡΡΑ ΑΝΝΑ-ΜΑΡΙΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι ορμόνες απαραίτητες για τη ζωή, με ποικίλες δράσεις στη ρύθμιση του μεταβολισμού και της ομοιοστασίας, στη λειτουργία του ανοσοποιητικού, την ανάπτυξη του σκελετού, την αναπαραγωγή, τη γνώση, τη συμπεριφορά, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την επιβίωση. Όλες οι δράσεις των γλυκοκορτικοειδών διενεργούνται μέσω του συγγενή τους υποδοχέα, τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR), που δρα είτε γενωμικά είτε μη γενωμικά. Ποικίλες μελέτες καταδεικνύουν τα γλυκοκορτικοειδή ως πολύ αποτελεσματικούς αντι-φλεγμονώδεις και αντι-καρκινικούς παράγοντες, γι' αυτό και πληθώρα συνθετικών γλυκοκορτικοειδών, όπως η δεξαμεθαζόνη (Dexamethasone, DEX) αποτελούν την κύρια θεραπεία σε χρόνιες φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες νόσους, σε αλλεργικές αντιδράσεις, αλλά και σε περιπτώσεις καρκίνων του αίματος. Ωστόσο, παρά τις ευεργετικές τους δράσεις, η χρόνια χρήση τους συσχετίζεται με εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών στον οργανισμό του ασθενή, με πιο τρανταχτά παραδείγματα την οστεοπόρωση, τη μυϊκή ατροφία και τον διαβήτη. Υπάρχει λοιπόν η ανάγκη, να ελαχιστοποιηθούν στο μέγιστο βαθμό αυτές οι παρενέργειες, γι' αυτό και τις τελευταίες δεκαετίες έντονο ενδιαφέρον προς μελέτη, παρουσιάζουν ενώσεις που χαρακτηρίζονται ως επιλεκτικοί ρυθμιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Selective Glucocorticoid Receptor Modulators, SEGRMs). Οι ενώσεις αυτές, διατηρούν την αντιφλεγμονώδη δράση των γλυκοκορτικοειδών, χωρίς ή με μειωμένες τις σοβαρές παρενέργειες. Τα πεντακυκλικά τριτερπενοειδή είναι ενώσεις φυτικής προέλευσης, που παρουσιάζουν έντονες αντι-φλεγμονώδεις και αντι-καρκινικές δράσεις, καθώς και δομικές ομοιότητες με τα γλυκοκορτικοειδή, που μπορεί να τα καταστήσουν εν δυνάμει SEGRMs. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί κατά πόσο τα παράγωγα των τριτερπενοειδών μπετουλινικό (betulinic) και μπουσβελλικό οξύ (boswellic acid), μπορεί να αποτελέσουν εν δυνάμει SEGRMs. Πειράματα ανοσοκυτταροχημικής μελέτης έδειξαν ότι οι παραπάνω ουσίες προωθούν την πυρηνική μετατόπιση του GR. Επιπρόσθετα, τα παράγωγα του μπουσβελλικού οξέος παρουσίασαν αντι-φλεγμονώδη δράση, ενώ τα παράγωγα του μπετουλινικού οξέος που μελετήθηκαν δεν παρουσίασαν σημαντική αντι-φλεγμονώδη δράση. Στην παρούσα διπλωματική, εφαρμόστηκε η δοκιμασία λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης, τόσο σε κύτταρα HeLa όσο και σε κύτταρα HEK293, για τον έλεγχο της εξαρτώμενης από GREs μεταγραφής γονιδίων αναφοράς (λουσιφεράση). Τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμασίας επιβεβαιώθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western, σε κύτταρα HeLa και σε κύτταρα HepG2, για τα πρωτεϊνικά επίπεδα της καρβοξυκινάσης του φώσφο-ενόλο-πυροσταφυλικού, μορίου-στόχου της μεταγραφικής ενεργοποίησης του GR, που εμπλέκεται στη διαδικασία της γλυκονεογένεσης. Τα αποτελέσματα από αντίστοιχες μελέτες με παράγωγα του μπετουλινικού οξέος δείχνουν μία τάση για μείωση της επαγόμενης από δεξαμεθαζόνη (DEX) μεταγραφικής δραστηριότητας του GR και υποδεικνύεται ότι η αποτελεσματικότητα της δράσης των ουσιών αυτών σχετίζεται με το χρόνο φύλαξης, δεδομένου ότι με την πάροδο του χρόνου, μειώνεται η παρατηρούμενη δραστηριότητά τους. Όσον αφορά τα παράγωγα του μπουσβελλικού οξέος, δεν φαίνεται να επάγουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του GR. Τέλος, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, αξιολογήθηκε η επίδραση των παραγώγων του μπουσβελλικού οξέος στα πρωτεϊνικά επίπεδα μορίων που εμπλέκονται στο εξαρτώμενο από τον GR αποπτωτικό μονοπάτι. Η μελέτη εφαρμόστηκε τόσο σε κύτταρα HeLa όσο και σε κύτταρα HepG2. Τα αποτελέσματα από την κυτταρική σειρά HepG2 δείχνουν πως η παρουσία των ουσιών φαίνεται να μειώνει τα επίπεδα της προ-κασπάσης 3 (μη ενεργοποιημένης), γεγονός που υποδεικνύει πιθανή αποπτωτική και αντι-καρκινική δράση για τα παράγωγα του μπουσβελλικού οξέος.

Συνοψίζοντας οι προαναφερθείσες ενώσεις φέρουν δυναμικό επιλεκτικής ενεργοποίησης του GR και κατά συνέπεια να μελετηθούν περαιτέρω ως εν δυνάμει SEGRMs.

ABSTRACT

Glucocorticoids are hormones important for life, with a variety of actions in the regulation of metabolism and homeostasis, immune function, skeletal development, reproduction, knowledge, behavior, cell proliferation and survival. All glucocorticoid effects are mediated through their cognate receptor, the glucocorticoid receptor (GR), which acts either through genomic or non-genomic pathways. Various studies have shown that glucocorticoids are very effective anti-inflammatory and anti-cancer agents, and for this reason many synthetic glucocorticoids are the primary therapy in chronic inflammatory or autoimmune diseases and allergic reactions, but also in some cases of blood cancers. However, despite their beneficial effects, the chronic use of glucocorticoids is associated with the occurrence of adverse effects in the patient, such as osteoporosis, muscle atrophy and diabetes. Therefore, there is a need to minimize these side effects to the greatest extent. Hence, in the last few decades, compounds characterized as Selective Glucocorticoid Receptor Modulators (SEGRMs) are of great interest. These compounds retain the anti-inflammatory effect of glucocorticoids, but they lack the serious side effects. Pentacyclic triterpenoids are compounds of plant origin that exhibit strong anti-inflammatory and anti-cancer effects, in combination with their structural similarity to glucocorticoids, so they may be able to act and be described as SEGRMs. The aim of this thesis, was to study whether molecules that are derivatives of betulinic and boswellic acid can act as SEGRMs. Immunofluorescence analysis revealed that the above-mentioned compounds promote the translocation of GR into the nucleus. In addition, the boswellic acid derivatives exhibited anti-inflammatory activity, whereas the betulinic acid derivatives examined did not show considerable anti-inflammatory activity. In the present study, the luciferase/ β -galactosidase assay was applied on both HeLa and HEK293 cell lines for the evaluation of the GRE-dependent gene transcription in the presence of the betulinic and boswellic acid derivatives, using as a reporter gene that of luciferase. The results of this assay were confirmed by Western Blot analysis, where the protein levels of phosphoenolpyruvate carboxykinase were checked in cell extracts from HeLa and HepG2 cells. The gene that encodes for phosphoenolpyruvate carboxykinase is a molecular target of GR transcriptional activity and the protein itself is involved in the gluconeogenesis pathway. The results from betulinic acid derivatives show a tendency to decrease the GR transcriptional activity in the presence of DEX, and it is suggested that the efficacy of the action of these substances is related to the storage time, since their activity seems to attenuate over time. As regards the results from the boswellic acid derivatives, these compounds do not appear to induce the GR transcriptional activity. Finally, the effect of the boswellic acid derivatives was evaluated on the protein levels of molecules involved in the GR-dependent apoptotic pathway, via Western Blot analysis. Cell extracts from Hela and HepG2 cell lines were analyzed. The results from the HepG2 cell line show that the presence of these certain compounds tends to decrease the levels of pro-caspase 3, indicating a possible apoptotic and anti-cancer effect for boswellic acid derivatives. To sum up, the above-mentioned compounds have the potential to selectively activate the transcriptional activity of GR, and for this reason, they can be further evaluated as potential SEGRMs.

Περιεχόμενα

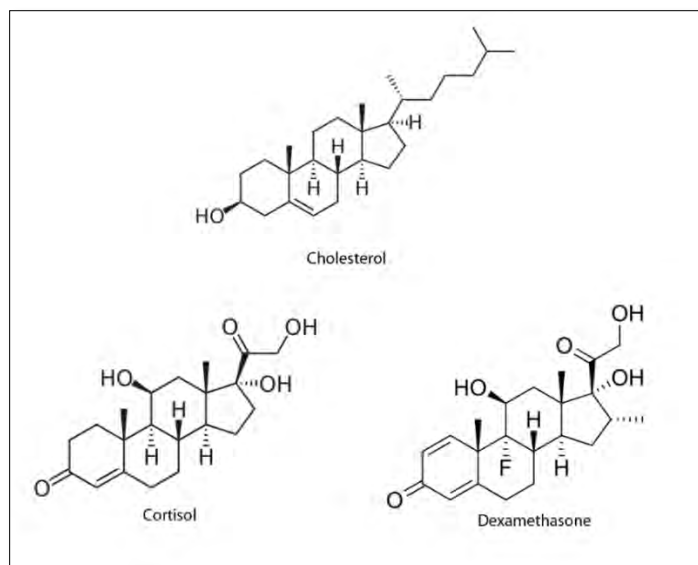
1.	Εισαγωγή.....	7
1.1	Γλυκοκορτικοειδή	7
1.2	Ο Υποδοχέας των Γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR)	8
1.2.1	Η δομή του GR	8
1.2.2	Το γονίδιο του GR, οι πολυμορφισμοί και οι διαφορετικές ισομορφές	10
1.2.3	Μηχανισμοί δράσης του GR.....	12
1.3	Γλυκοκορτικοειδή και αντι-φλεγμονώδης δράση	15
1.4	Γλυκοκορτικοειδή και μεταβολισμός γλυκόζης	16
1.5	Γλυκοκορτικοειδή και κυτταρική επιβίωση ή απόπτωση.....	17
1.6	Εκλεκτικοί ρυθμιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών-Selective Glucocorticoid Receptor Modulators (SEGRMs).....	21
1.7	Τριτερπενοειδή και SEGRMs	22
2.	Υλικά και μέθοδοι.....	26
2.1	Υλικά	26
2.1.1	Αντιδραστήρια	26
2.1.2	Πλασμιδιακοί Φορείς.....	28
2.1.3	Βακτηριακά Στελέχη.....	28
2.1.4	Κυτταρικές σειρές	28
2.2	Μέθοδοι	29
2.2.1	Ανοσοκυτταροχημεία.....	29
2.2.2	Δοκιμασία λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης	29
2.2.3	Ανοσοαποτύπωση κατά Western	31
3.	Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	34
3.1	Επίδραση των παραγώγων του μπετουλινικού οξέος στη μεταγραφική δραστικότητα του GR και πιο ειδικά στο μηχανισμό trans-ενεργοποίησης	34
3.2	Επίδραση των παραγώγων του μποςβελλικού οξέος στη μεταγραφική δραστικότητα του GR και πιο ειδικά στο μηχανισμό trans-ενεργοποίησης	38
3.3	Επίδραση των παραγώγων του μποςβελλικού οξέος στην εξαρτώμενη από τον GR απόπτωση ..	44
4.	Συμπεράσματα	46
4.1	Παράγωγα του μπετουλινικού οξέος	46
4.2	Παράγωγα του μποςβελλικού οξέος	46
5.	Βιβλιογραφία	48
	Ευχαριστίες.....	50

1. Εισαγωγή

1.1 Γλυκοκορτικοειδή

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι ορμόνες απαραίτητες για τη ζωή, που συντίθενται κι εκκρίνονται από τη φλοιώδη μοίρα των επινεφριδίων υπό τον έλεγχο ενός νευροενδοκρινούς συστήματος ανατροφοδότησης, του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια (Ortsäter et al., 2012, Oakley et al., 2013). Εσωτερικά ή εξωτερικά σήματα, όπως το κirkάδιο ρολόι ή το στρες αντίστοιχα, πυροδοτούν την έκκριση της ορμόνης απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης (Corticotropin Releasing Hormone, CRH) από τον υποθάλαμο που δρα στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, για να διεγείρει την έκκριση της κορτικοτροπίνης ή φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (Adrenocorticotrophic hormone, ACTH). Η ACTH στη συνέχεια δρα στον φλοιό των επινεφριδίων για να διεγείρει την παραγωγή κι έκκριση των γλυκοκορτικοειδών (Oakley et al., 2013). Τα γλυκοκορτικοειδή που εκκρίνονται εξασκούν μια άμεση αρνητική ανατροφοδοτική επίδραση 1) στον υποθάλαμο για ελάττωση της παραγωγής CRH και 2) στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης για ελάττωση της παραγωγής ACTH. Οι ανατροφοδοτικές αυτές επιδράσεις συμβάλλουν στη ρύθμιση της συγκέντρωσης των γλυκοκορτικοειδών στο πλάσμα (Guyton et al., 2008).

Όπως όλες οι στεροειδείς ορμόνες, έτσι και τα γλυκοκορτικοειδή προέρχονται από την χοληστερόλη, μέσω του μονοπατιού της πρεγνενολόνης με μια σειρά ενζυμικών αντιδράσεων. Περιέχουν τον τετρακυκλικό δακτύλιο της χοληστερόλης και το ίδιο σύστημα αρίθμησης των ανθράκων (Ortsäter et al., 2012). Η κορτιζόλη αποτελεί ένα από τα πιο γνωστά φυσικά γλυκοκορτικοειδή με πολύ ισχυρή δράση, αλλά υπάρχουν και συνθετικά όπως η δεξαμεθαζόνη (Dexamethasone, DEX), με δράση 30 φορές μεγαλύτερη από της κορτιζόλης, η πρεδνιζόνη και η μεθυλοπρεδνιζόνη (Guyton et al., 2008).



Εικόνα 1. Χημική δομή των μορίων χοληστερόλη, κορτιζόλη και δεξαμεθαζόνη (τροποποιημένη εικόνα από Wang et al., 2015, chapter 1).

Τα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών στην κυκλοφορία παρουσιάζουν έναν εγγενή ημερήσιο κύκλο με μια απότομη αύξηση μετά την αφύπνιση που ελαττώνεται κατά τη διάρκεια της ημέρας (Ortsäter et al., 2012). Επιδρούν σχεδόν σε κάθε όργανο και ιστό στο σώμα και αποσκοπούν στη διατήρηση της ομοιοστασίας, τόσο ως απόκριση στις φυσιολογικές ημερήσιες μεταβολικές αλλαγές όσο και ενάντια στις στρεσογόνες διαταραχές (Oakley et al., 2013). Ρυθμίζουν μια πληθώρα βιολογικών διεργασιών, όπως είναι ο μεταβολισμός της γλυκόζης, των πρωτεϊνών και των λιπαρών οξέων, η λειτουργία του ανοσοποιητικού, η ανάπτυξη του σκελετού, η αναπαραγωγή, η γνώση, η συμπεριφορά, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η επιβίωση (Oakley et al., 2011 & 2013). Λόγω των ισχυρών αντι-φλεγμονωδών και ανοσοκατασταλτικών τους δράσεων, τα γλυκοκορτικοειδή ανήκουν στη λίστα των πιο συχνά συνταγογραφούμενων φαρμάκων (Oakley et al., 2013). Τον τελευταίο μισό αιώνα τα συνθετικά γλυκοκορτικοειδή έχουν γίνει απαραίτητα για τη θεραπεία φλεγμονωδών, ανοσοποιητικών και αλλεργικών διαταραχών (όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και το άσθμα), εγκεφαλικών οίδημάτων και διαφόρων τύπων καρκίνου του αίματος (όπως το πολλαπλό μυέλωμα), ενώ χρησιμοποιούνται και για την πρόληψη απόρριψης μοσχευμάτων (Oakley et al., 2013, Sundahl et al., 2015). Σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν, γίνεται κατανοητό ότι τα γλυκοκορτικοειδή είναι απαραίτητα για την ομαλή ανάπτυξη και λειτουργία ενός οργανισμού, γι' αυτό και αδυναμία ρύθμισης των γλυκοκορτικοειδών στα απαραίτητα επίπεδα συνδέεται με παθολογικές καταστάσεις. Τέτοιες είναι η νόσος Addison και η νόσος Cushing, που παρατηρούνται σε άτομα με μειωμένη και σε άτομα με αυξημένη επινεφριδιακή λειτουργία, αντίστοιχα (Guyton et al., 2008).

Τόσο οι φυσιολογικές λειτουργίες όσο και οι φαρμακευτικές ιδιότητες των γλυκοκορτικοειδών που αναφέρθηκαν παραπάνω, διενεργούνται από τον υποδοχέα τους, τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR) (Oakley et al., 2011).

1.2 Ο Υποδοχέας των Γλυκοκορτικοειδών (Glucocorticoid Receptor, GR)

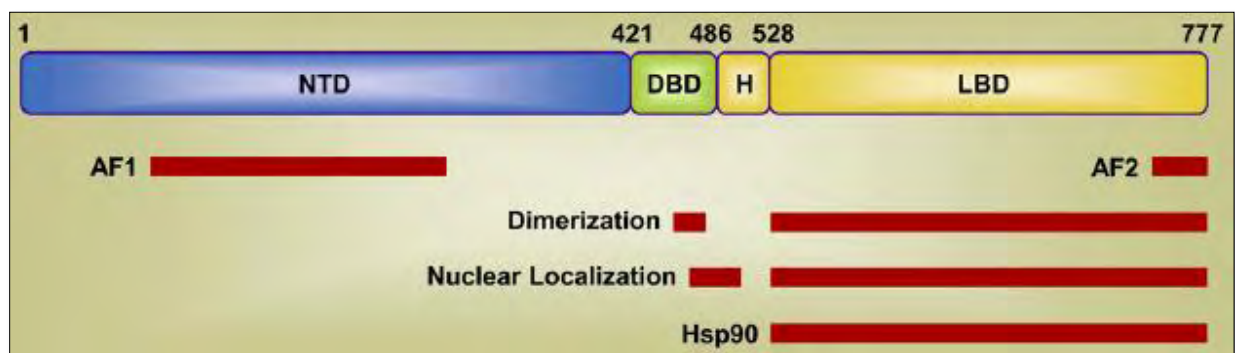
1.2.1 Η δομή του GR

Ο υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών (GR) αποτελεί μέλος της υπερ-οικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων και φέρει δράση προσδέτο-εξαρτώμενου μεταγραφικού παράγοντα. Όσο αφορά τον υποκυτταρικό του εντοπισμό, βρίσκεται κατανεμημένος στο κυτταρόπλασμα όλων σχεδόν των ανθρώπινων κυτταρικών τύπων, ενώ μελέτες δείχνουν ότι υπάρχουν ισομορφές αυτού και στην κυτταρική μεμβράνη (Sundahl et al., 2015, Grzanka et al., 2011).

Δομικά μπορεί να περιγραφεί ως μια αρθρωτή πρωτεΐνη, μεγέθους περίπου 90 kDa που φέρει τρεις διακριτές λειτουργικές επικράτειες: μια επικράτεια trans-ενεργοποίησης στο N-τελικό άκρο (N-terminal trans-activation domain, NTD), μια κεντρική επικράτεια πρόσδεσης στο DNA (DNA binding domain, DBD) και μια επικράτεια σύνδεσης του προσδέτη στο C-τελικό άκρο (Ligand Binding Domain, LBD). Οι επικράτειες DBD και LBD διαχωρίζονται από μια εύκαμπτη περιοχή του μορίου, που ονομάζεται περιοχή άρθρωσης. Το DBD είναι η πιο συντηρημένη περιοχή σε όλη την υπερ-οικογένεια των υποδοχέων στεροειδών ορμονών και περιέχει δύο μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου (Oakley et al., 2011 & 2013). Το πρώτο δάκτυλο ψευδαργύρου είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση και πρόσδεση σε αλληλουχίες-στόχους στο DNA, γνωστές

ως στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid Responsive Elements, GREs). Το δεύτερο έχει ως ρόλο την σταθεροποίηση της πρόσδεσης του υποδοχέα στο DNA. Το NTD περιέχει την επικράτεια μεταγραφικής ενεργοποίησης AF1 (Activation Function 1), η οποία αλληλεπιδρά με ποικίλους συν-ρυθμιστές και συστατικά του βασικού μηχανισμού της μεταγραφής (Oakley et al., 2013, Wang et al., 2015, chapter 1). Η AF1 φέρει αρκετές θέσεις για φωσφορυλίωση, άρα αποτελεί στόχο της μετα-μεταφραστικής τροποποίησης του GR, διαδικασία που μπορεί να επηρεάσει τις βασικές λειτουργίες του υποδοχέα, όπως η αλληλεπίδραση με τον προσδέτη, το DNA, αλλά και με συν-ρυθμιστές (Wang et al., 2015). Το LBD, αποτελούμενο από 12 α-έλικες και 4 β-πτυχωτά φύλλα, σχηματίζει μια υδρόφοβη «τσέπη» για την πρόσδεση των γλυκοκορτικοειδών και περιέχει την επικράτεια AF2, η οποία αλληλεπιδρά με συν-ρυθμιστές με έναν προσδέτο-εξαρτώμενο τρόπο. Τέλος, για τη μεταφορά του στον πυρήνα, φέρει δύο σήματα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NL), το ένα στην περιοχή μεταξύ DBD/άρθρωσης και το άλλο στην επικράτεια LBD (Oakley et al., 2011 & 2013).

Απουσία των γλυκοκορτικοειδών, ο GR παραμένει στο κυτταρόπλασμα ως μέρος ενός μεγάλου πολυ-πρωτεϊνικού συμπλόκου, που περιλαμβάνει πρωτεΐνες-μοριακές συνοδούς, όπως η Heat Shock Protein 90 (Hsp90), η Hsp70, η Hsp40, η συν-μοριακός συνοδός p23 και ανοσοφυλίνες της οικογένειας FK506 και Cyp40, που τον προστατεύουν από την αποικοδόμηση (Vandevyver et al., 2013). Αυτές οι πρωτεΐνες διατηρούν τον GR σε μια διαμόρφωση που είναι μεταγραφικά ανενεργή, αλλά ευνοεί τη σύνδεση του προσδέτη στο LBD (Oakley et al., 2013, Kleiman et al., 2007). Η σύνδεση των γλυκοκορτικοειδών στο LBD, επιφέρει αλλαγές στη διαμόρφωση του GR, που οδηγούν σε απομάκρυνση των πρωτεϊνών-συνοδών κι έκθεση των σημάτων πυρηνικού εντοπισμού, με αποτέλεσμα τη μεταφορά του υποδοχέα στον πυρήνα μέσω των ιμπορτινών. Όταν βρεθεί στον πυρήνα διμερίζεται και ασκεί τις δράσεις του (Oakley et al., 2011).



Εικόνα 2. Παρουσίαση της δομικής οργάνωσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, όπου διακρίνονται οι τρεις λειτουργικές επικράτειες NTD, DBD και LBD καθώς και οι περιοχές AF1 και AF2 του υποδοχέα που εμπλέκονται στη μεταγραφή. Ακόμη, στην εικόνα παρουσιάζονται και οι περιοχές που παίζουν ρόλο στο διμερισμό, την πυρηνική μετατόπιση και την αλληλεπίδραση του GR με την Hsp90 (Oakley et al., 2011).

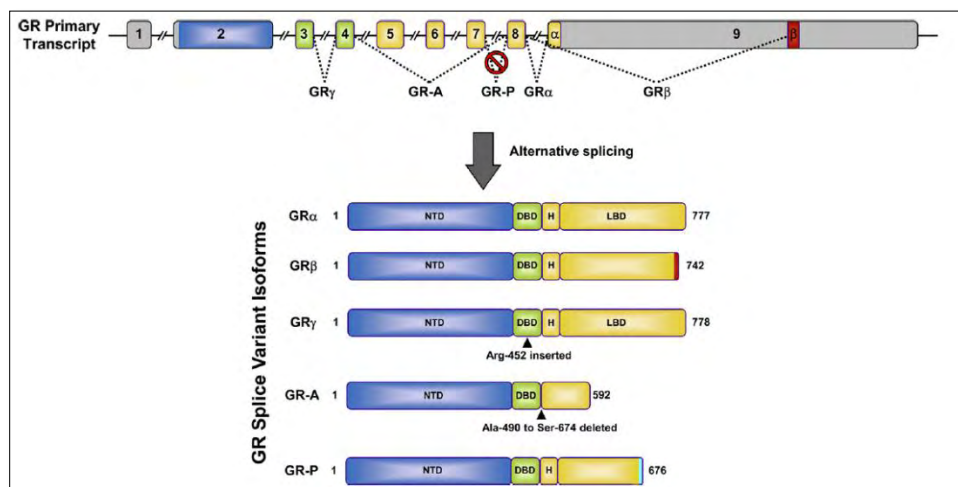
1.2.2 Το γονίδιο του GR, οι πολυμορφισμοί και οι διαφορετικές ισομορφές

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον GR στον άνθρωπο περιλαμβάνει 9 εξόνια κι εδράζεται στο χρωμόσωμα 9, στη θέση 5q31-32 (Oakley et al., 2011). Γενωμικές αναλύσεις έχουν αποκαλύψει την ύπαρξη δύο πολυμορφισμών του γονιδίου του GR. Ο πολυμορφισμός με το όνομα ER22/23EK συναντάται σε ποσοστό περίπου 3% στον πληθυσμό και στα άτομα αυτά ο GR παρουσιάζει μειωμένη μεταγραφική δραστικότητα. Για το λόγο αυτό, ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός σχετίζεται με απώλεια ευαισθησίας στα γλυκοκορτικοειδή. Άτομα με αυτόν τον πολυμορφισμό, φαίνεται να έχουν μειωμένη τάση εμφάνισης νόσων όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II, γι' αυτό και υπάρχει η υπόθεση ότι ο πολυμορφισμός ER22/23EK προσδίδει στους φορείς ένα πιο ευνοϊκό μεταβολικό προφίλ. Ο πολυμορφισμός με όνομα N363S απαντάται στο 4% του πληθυσμού, και σε αντίθεση με τον πολυμορφισμό ER22/23EK, οδηγεί σε αυξημένη μεταγραφική δραστικότητα του GR και έχει σχετιστεί με υπερ-ευαισθησία στα γλυκοκορτικοειδή. Σε αυτούς τους πολυμορφισμούς ίσως να οφείλεται, έστω και μερικώς, η ποικιλότητα που παρατηρείται στην απόκριση των ασθενών ως προς τη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή (Oakley et al., 2013).

Λόγω εναλλακτικού ματίσματος σε διαφορετικά εξόνια, προκύπτουν πολλές διαφορετικές ισομορφές, όπως οι GR α , GR β , GR γ , GR-A και GR-P (Oakley et al., 2011). Το εξόνιο 2 κωδικοποιεί για το μεγαλύτερο μέρος της επικράτειας NTD, τα εξόνια 3 και 4 για την DBD και τα εξόνια 5-9 για την περιοχή της άρθρωσης και την LBD. Εναλλακτικό μάτισμα στο εξόνιο 9 παράγει τις ισομορφές GR α και GR β . Η ισομορφή GR α προκύπτει από συρραφή του τέλους του εξονίου 8 με την αρχή του εξονίου 9, ενώ η ισομορφή GR β προκύπτει από συρραφή του τέλους του εξονίου 8 με το μέσο περίπου του εξονίου 9. Αυτές οι δύο πρωτεΐνες είναι πανομοιότυπες μέχρι το αμινοξύ 727, αλλά μετά από αυτό η αλληλουχία τους αποκλίνει. Η ισομορφή GR α , που είναι και η πιο επικρατούσα, έχει το πλήρες μέγεθος και φέρει επιπλέον 50 αμινοξέα μετά το αμινοξύ 727. Στον αντίποδα, η ισομορφή GR β φέρει επιπλέον 15 αμινοξέα μετά το αμινοξύ 727, που όμως δεν παρουσιάζουν ομολογία με τα επιπλέον 50 αμινοξέα της ισομορφής GR α . Αυτή η διαφορά στο καρβοξυτελικό άκρο προσδίδει στον GR β μοναδικές ιδιότητες, όπως η ανικανότητα πρόσδεσης γλυκοκορτικοειδών, αφού δεν φέρει μεγάλο μέρος του LBD, και ο μόνιμος εντοπισμός του στον πυρήνα αντί του κυτταροπλάσματος. Μελέτες έχουν δείξει ότι όταν αυτές οι ισομορφές συν-εκφράζονται σε ένα κύτταρο, ο GR β δρα σαν αναστολέας και ανταγωνίζεται τη δράση του GR α στα γονίδια-στόχους. Αυτή η ικανότητα του GR β υποδεικνύει ότι υψηλά επίπεδα αυτού μπορεί να προκαλέσουν αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή. Γενικά, ο GR β επικρατεί σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, αλλά στην πλειοψηφία αυτών, βρίσκεται σε χαμηλότερα επίπεδα από τον GR α . Επιπλέον, η έκφραση του GR β μπορεί να αυξηθεί από προ-φλεγμονώδεις παράγοντες και μεσολαβητές του ανοσοποιητικού, με αποτέλεσμα τη μειωμένη ευαισθησία του οργανισμού στα γλυκοκορτικοειδή, όπως και έχει παρατηρηθεί σε πολλές φλεγμονώδεις νόσους. Πρόσφατες ανακαλύψεις προτείνουν και περαιτέρω δράσεις για τον GR β , όσο αφορά τη δράση του στην κυτταρική σηματοδότηση και τη φυσιολογία του οργανισμού, καθώς βρέθηκε ότι έχει την ικανότητα να επάγει ή να καταστέλλει με άμεσο τρόπο την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων, ανεξάρτητων από την ανταγωνιστική δράση που παρουσιάζει ως προς την ισομορφή GR α . Τα γεγονότα αυτά υποδεικνύουν ότι η ισομορφή GR β

μπορεί να δράσει σαν μεταγραφικός παράγοντας μέσω γενωμικών δράσεων, διακριτών από την ανταγωνιστική του δράση ως προς την ισομορφή GR α (Oakley et al., 2013).

Με εναλλακτικό μάτισμα στα εξόνια 3 και 4, προκύπτει η ισομορφή GR γ που μπορεί να προσδέσει γλυκοκορτικοειδή, αλλά και να προσδεθεί στο DNA με τρόπο παρόμοιο με την ισομορφή GR α . Ωστόσο, έχει μειωμένη ικανότητα ρύθμισης γονιδίων που αποκρίνονται στα γλυκοκορτικοειδή και παρουσιάζει ένα διαφορετικό προφίλ ως προς τα γονίδια που ελέγχει συγκριτικά με την ισομορφή GR α . Τέλος, εναλλακτικό μάτισμα μεταξύ των εξονίων 5-7 και 8-9 έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή των ισομορφών GR-A και GR-P, αντίστοιχα. Λόγω του γεγονότος ότι στον GR-A απουσιάζει η αρχή του LBD, ενώ στον GR-P το τέλος, καμία από τις δύο αυτές ισομορφές δεν φέρει ικανότητα σύνδεσης με γλυκοκορτικοειδή. Για την ισομορφή GR-A λίγα είναι γνωστά, ενώ η ισομορφή GR-P φαίνεται να είναι η κύρια ισομορφή σε καρκινικά κύτταρα με ανθεκτικότητα στα γλυκοκορτικοειδή και έχει δείχθει ότι μπορεί να ρυθμίζει τη μεταγραφική δραστηριότητα της ισομορφής GR α με έναν τρόπο που εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο στον οποίο συναντώνται (Oakley et al., 2013).



Εικόνα 3. Απεικόνιση των ισομορφών του GR που προκύπτουν από το εναλλακτικό μάτισμα στο γονίδιο που κωδικοποιεί για τον GR στον άνθρωπο. Η πιο επικρατούσα ισομορφή που φέρει και το πλήρες μέγεθος είναι η ισομορφή GR α , ενώ οι ισομορφές GR β , GR γ , GR-A και GR-P φέρουν λιγότερα αμινοξέα. Οι ισομορφές GR α και GR γ διαθέτουν ικανότητα σύνδεσης με γλυκοκορτικοειδή και παρουσιάζουν μεταγραφική δραστηριότητα, ενώ οι υπόλοιπες τρεις ισομορφές λόγω ματίσματος που επηρεάζει την επικράτεια LBD δεν φέρουν αυτή την ικανότητα (Oakley et al., 2011).

Πέρα όμως από το εναλλακτικό μάτισμα, ένας επιπλέον μηχανισμός που αυξάνει τον αριθμό των διαφορετικών ισομορφών του GR και πιο ειδικά του GR α , είναι η έναρξη της μεταγραφής από διαφορετικά σημεία του ίδιου μεταγράφου (Sundahl et al, 2015). Έτσι λοιπόν, προκύπτουν οκτώ ακόμη ισομορφές (GR α -A, GR α -B, GR α -C1, GR α -C2, GR α -C3, GR α -D1, GR α -D2 και GR α -D3) με διαφορετικό μέγεθος αμινοτελικού άκρου, με κοινές αλλά και μοναδικές ιδιότητες. Και οι οκτώ παρουσιάζουν παρόμοια συγγένεια για τα γλυκοκορτικοειδή και παρόμοια ικανότητα πρόσδεσης στα GREs αφότου ενεργοποιηθούν από τον προσδέτη. Οι ισομορφές GR α -A, GR α -B, και GR α -C βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και η σύνδεση των γλυκοκορτικοειδών τις οδηγεί στον πυρήνα, ενώ οι ισομορφές GR α -D εδράζονται μονίμως στον πυρήνα. Η πιο τρανταχτή

ίσως διαφορά τους είναι ότι κάθε μια από αυτές τις οκτώ ισομορφές παρουσιάζει ένα διαφορετικό προφίλ ρύθμισης γονιδίων. Αυτή η τελευταία ιδιότητα οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η κυτταρική απόκριση στο εκάστοτε γλυκοκορτικοειδές θα εξαρτηθεί από το ρεπερτόριο των ισομορφών που παρουσιάζει το συγκεκριμένο κύτταρο (Oakley et al., 2013).

Κάθε μια από όλες τις προαναφερθείσες ισομορφές του GR υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που ρυθμίζουν περαιτέρω τη λειτουργία του υποδοχέα κι επεκτείνουν το ρεπερτόριο των διαθέσιμων ισομορφών για σηματοδότηση, έπειτα από τη σύνδεση των γλυκοκορτικοειδών. Τέτοιες τροποποιήσεις είναι η φωσφορυλίωση, η ουβικουιλίνωση, η σουμοϋλίωση και η ακετυλίωση. Ανάλογα με το ποια κατάλοιπα σερίνης είναι φωσφορυλιωμένα, μπορεί να επηρεαστεί η μεταγραφική δραστηριότητα του GR είτε σε επίπεδο αλληλεπίδρασης με συν-παράγοντες είτε σε επίπεδο διάρκειας ζωής του υποδοχέα. Η ουβικουιλίνωση επηρεάζει το χρόνο ζωής του GR, ενώ η σουμοϋλίωση ανάλογα με τη θέση στην οποία έχει προστεθεί η πρωτεΐνη SUMO, μπορεί να ενισχύσει ή να καταστείλει τη μεταγραφική δραστηριότητα του GR. Τέλος, η ακετυλίωση καταλοίπων λυσίνης φαίνεται να περιορίζει τις ανασταλτικές δράσεις του GR και πιο ειδικά στους μεταγραφικούς παράγοντες που σχετίζονται με τη φλεγμονή (Oakley et al., 2013).

Με όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, γίνεται αντιληπτό ότι σε κάθε κύτταρο εκφράζεται ένα σύνθετο ρεπερτόριο υποδοχέων GR, που σε συνδυασμό με τα διαφορετικά γλυκοκορτικοειδή, τα διαφορετικά GREs και τους διαφορετικούς συν-ρυθμιστές, είτε πρόκειται για ενεργοποιητές είτε για καταστολείς, επιδρούν στην κυτταρική απόκριση (Oakley et al., 2013).

1.2.3 Μηχανισμοί δράσης του GR

1.2.3.1 Γενωμικές δράσεις

Οι γενωμικές δράσεις του GR αφορούν στις μεταβολές που προκαλεί στα επίπεδα του mRNA γονιδίων-στόχων. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να οφείλονται σε αλλαγές στη μεταγραφή ή στο χρόνο ζωής του mRNA. Αφότου ο κυτταροπλασματικός GR ενεργοποιηθεί από τα γλυκοκορτικοειδή, μεταβαίνει στον πυρήνα, όπου αλληλεπιδρά είτε άμεσα είτε έμμεσα με το DNA (Mitre-Aguilar et al., 2015).

Η άμεση αλληλεπίδραση με το DNA, περιλαμβάνει την πρόσδεση του GR σε στοιχεία απόκρισης στα γλυκοκορτικοειδή (GREs). Τα GREs μπορεί να βρίσκονται είτε πριν τους υποκινητές των γονιδίων-στόχων είτε εντός της κωδικής περιοχής των γονιδίων αυτών (Kadmiel et al., 2013). Πρόκειται για παλίνδρομες αλληλουχίες που φέρουν τη μορφή GGAACAnnnTGTCT και η πρόσδεση του GR σε αυτά φαίνεται να σχετίζεται με τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων-στόχων (Oakley et al., 2013). Από την αλληλουχία των GREs, το 1/3 των βάσεων είναι υψηλά συντηρημένο, ενώ τα 2/3 εμφανίζουν ποικίλες μεταβολές μεταξύ των διαφορετικών γονιδίων, με αποτέλεσμα αυτή η μεταβλητότητα στην αλληλουχία των GREs να καθοδηγεί το αποτέλεσμα της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR (Kadmiel et al., 2013). Έχουν περιγραφεί 3 μηχανισμοί μέσω των οποίων ο GR μπορεί να επιφέρει την trans-ενεργοποίηση γονιδίων με άμεσο τρόπο. Εάν το GRE βρίσκεται κοντά στην περιοχή TATA box, ο GR μπορεί να στρατολογήσει γενικούς μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο TAFIIID και να προωθήσει τη μεταγραφή. Από την άλλη, εάν το GRE βρίσκεται μακριά από

αυτή την περιοχή, τότε ο GR μπορεί να αλληλεπιδράσει με συν-ρυθμιστές που λειτουργούν ως γέφυρες για την προαγωγή της στρατολόγησης του βασικού μηχανισμού της μεταγραφής (basal transcription machinery). Στον τρίτο μηχανισμό, ο GR μπορεί να στρατολογήσει σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, ώστε να ευνοείται η μεταγραφή. Τέτοια σύμπλοκα είναι οι ακέτυλ-τρανσφεράσες των ιστονών, όπως οι CBP, p300, PCAF και SRC-1. Παραδείγματα γονιδίων, των οποίων η έκφραση ενεργοποιείται από αυτές τις δράσεις του GR είναι το γονίδιο της αμινοτρανσφεράσης της τυροσίνης, το γονίδιο της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης και το γονίδιο της καρβοξυκινάσης του φώσφο-ενόλο-πυροσταφυλικού (Phosphoenolpyruvate Carboxykinase, PEPCK), που όλα εμπλέκονται στη διαδικασία της γλυκονεογένεσης στο ήπαρ (Mitre-Aguilar et al., 2015).

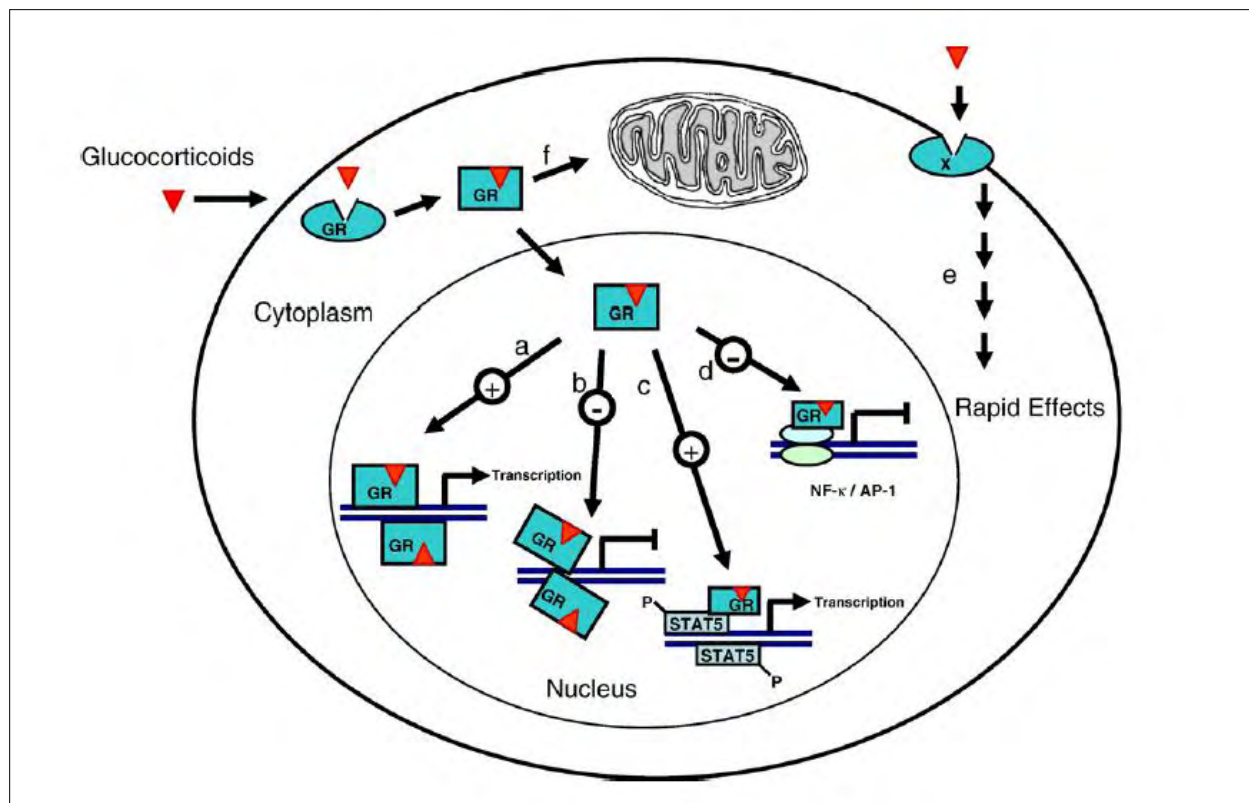
Ωστόσο, η άμεση σύνδεση του GR στο DNA μπορεί να επιφέρει και trans-καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων μέσω αρνητικών GREs (Negative GREs, nGREs) (Mitre-Aguilar et al., 2015). Τα nGREs που έχουν αναγνωρισθεί, έχουν την εξής αλληλουχία: CTCC(n)₀₋₂GGAGA και σε αυτά προσδένεται μονομερής ενεργοποιημένος GR, αντί για ομοδιμερή του υποδοχέα (Oakley et al., 2013). Σχεδόν πάντα, τα nGREs συναντώνται κοντά σε στοιχεία απόκρισης σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, με αποτέλεσμα η πρόσδεση του GR σε αυτά να ανταγωνίζεται και να εκτοπίζει την πρόσδεση των άλλων μεταγραφικών παραγόντων. Για παράδειγμα, στο ανθρώπινο γονίδιο FASL, το nGRE βρίσκεται κοντά στη θέση πρόσδεσης του NF-κB, με αποτέλεσμα η πρόσδεση του GR στο nGRE να οδηγεί σε καταστολή του γονιδίου που ελέγχει ο NF-κB. Άλλα γονίδια-στόχοι του GR που περιλαμβάνουν nGREs είναι το γονίδιο της οστεοκαλσίνης, της προλακτίνης και της CRH (Mitre-Aguilar et al., 2015).

Εναλλακτικά, ο GR μπορεί και ρυθμίζει έμμεσα την έκφραση γονιδίων-στόχων, αλληλεπιδρώντας με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες στον πυρήνα, χωρίς ο ίδιος να προσδεθεί άμεσα στο DNA. Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να οδηγήσει είτε σε ενεργοποίηση είτε σε καταστολή της μεταγραφής των υποκείμενων γονιδίων. Τέτοιοι μεταγραφικοί παράγοντες είναι το σύμπλοκο ενεργοποιημένης πρωτεΐνης 1 (Activated Protein Complex 1, AP-1), ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) και οι πρωτεΐνες μεταγωγής σήματος και μεταγραφής (Signal Transduction and Transcription Proteins, STAT). Το AP-1 είναι ένα ετεροδιμερές αποτελούμενο από τους μεταγραφικούς παράγοντες c-jun και c-fos, οδηγώντας στην έκφραση γονιδίων-στόχων. Ωστόσο, ο ενεργοποιημένος GR αλληλεπιδρά με την υπομονάδα c-jun του AP-1, με άμεσο επακόλουθο την παρεμπόδιση της δράσης του AP-1 και άρα την καταστολή γονιδίων-στόχων που κωδικοποιούν κυρίως για μεταλλοπρωτεΐνάσες. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση του NF-κB, όπου ο GR αλληλεπιδρά με την υπομονάδα p65, καταστέλλοντας τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του NF-κB. Στην περίπτωση των STAT, η σύνδεση του GR στον μεταγραφικό αυτό παράγοντα προάγει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων (Mitre-Aguilar et al., 2015). Για δεκαετίες υπήρχε η πεποίθηση ότι οι δράσεις του GR που καταλήγουν σε trans-ενεργοποίηση ευθύνονται για τις παρενέργειες που παρατηρούνται στη χρόνια θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή. Αντίθετα, η trans-καταστολή φαίνεται να σχετίζεται περισσότερο με τις ευεργετικές αντι-φλεγμονώδεις δράσεις του GR (Vandevyver et al., 2013).

Με ακόμη πιο έμμεσο τρόπο, ο ενεργοποιημένος GR μπορεί να δράσει και στο χρόνο ζωής του mRNA συγκεκριμένων γονιδίων, όπως το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (Tumor Necrosis Factor, TNF), που αποτελεί σημαντική προ-φλεγμονώδη κυτοκίνη. Αυτή η δράση επιτυγχάνεται μέσω επαγωγής της έκφρασης της τριστετραπολίνης, πρωτεΐνης με δάκτυλα ψευδαργύρου που φέρει ικανότητα σύνδεσης στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA. Η συγκεκριμένη περιοχή στην οποία προσδένεται η τριστετραπολίνη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του mRNA και στη μετάφρασή του. Αποτέλεσμα της σύνδεσης είναι η άμεση αποικοδόμηση του mRNA-στόχου μέσω στρατολόγησης ειδικών RNAσών (Mitre-Aguilar et al., 2015).

1.2.3.2 Μη γενωμικές δράσεις

Για πολλά χρόνια, οι γενωμικές δράσεις του GR θεωρούνταν ως ο μοναδικός μηχανισμός δράσης του. Ωστόσο, ο γενωμικός τρόπος δράσης συνεπάγεται καθυστερημένη απόκριση του κυττάρου στα γλυκοκορτικοειδή, καθώς η έναρξη της σύνθεσης ρυθμιστικών πρωτεϊνών συμβαίνει 20-30 λεπτά έως και ώρες μετά την έκθεση του κυττάρου σε γλυκοκορτικοειδή και μόνο τότε αρχίζει να αναπτύσσεται η δράση των γλυκοκορτικοειδών. Αυτό όμως δεν ήταν πάντα συμβατό με τις κλινικές παρατηρήσεις. Η κλινική πρακτική, αλλά και μελέτες *in vitro* και *in vivo* έδειξαν ορισμένα παραδείγματα δράσης των γλυκοκορτικοειδών, που συνέβαιναν γρήγορα, μέσα σε λίγα λεπτά ή ακόμη και δευτερόλεπτα, που απέκλειαν την παραγωγή πρωτεϊνών *de novo*. Η ισομορφή που συναντάται στη μεμβράνη του κυττάρου και πιο σπάνια οι κυτταροπλασματικές ισομορφές, ευθύνονται για τις μη γενωμικές δράσεις. Ο ενεργοποιημένος μεμβρανικός GR μπορεί να διεγείρει τη σύνθεση δευτερογενών αγγελιοφόρων και να εισέλθει σε αλληλεπιδράσεις με διαύλους ιόντων. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι γρήγορες δράσεις των γλυκοκορτικοειδών διενεργούνται μέσω αλληλεπιδράσεων με υποδοχείς που συνδέονται με ετεροτριμερείς G πρωτεΐνες (G Protein-Coupled Receptors, GPCRs). Τα γλυκοκορτικοειδή είτε άμεσα είτε μέσω του ενεργοποιημένου μεμβρανικού GR, μπορούν να προσδεθούν στην α υπομονάδα της ετεροτριμερούς G πρωτεΐνης, ενεργοποιώντας την αδενυλική κυκλάση και κατά συνέπεια το σηματοδοτικό μονοπάτι cAMP-πρωτεϊνικής κινάσης A. Ακόμη, η μεμβρανική ισομορφή του GR είναι σημαντικός ρυθμιστής της σηματοδότησης του υποδοχέα των T-λεμφοκυττάρων. Ίσως και οι κυτταροπλασματικές ισομορφές να παίζουν κάποιο ρόλο στις μη γενωμικές δράσεις του GR (Grzanka et al., 2011). Η σηματοδότηση του GR μέσω γενωμικών και μη μονοπατιών, αυξάνει την πολυπλοκότητα και την ποικιλότητα των βιολογικών δράσεων των γλυκοκορτικοειδών (Oakley et al., 2013).



Εικόνα 4. Απεικόνιση των μηχανισμών δράσης του GR. Μέσω άμεσης ή έμμεσης αλληλεπίδρασης με το DNA μπορεί να προωθήσει ή να καταστείλει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων, ενώ έχουν περιγραφεί και γρήγορες δράσεις που δεν απαιτούν την σύνθεση πρωτεϊνών *de novo* (Psarra et al., 2008).

1.3 Γλυκοκορτικοειδή και αντι-φλεγμονώδης δράση

Όπως ήδη πολλαπλώς αναφέρθηκε, τα γλυκοκορτικοειδή παρουσιάζουν έντονη αντι-φλεγμονώδη δράση και αποτελούν τη θεραπεία σε πολλές χρόνιες φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες νόσους. Πού οφείλεται όμως αυτή τους η ικανότητα και πώς επιτυγχάνεται;

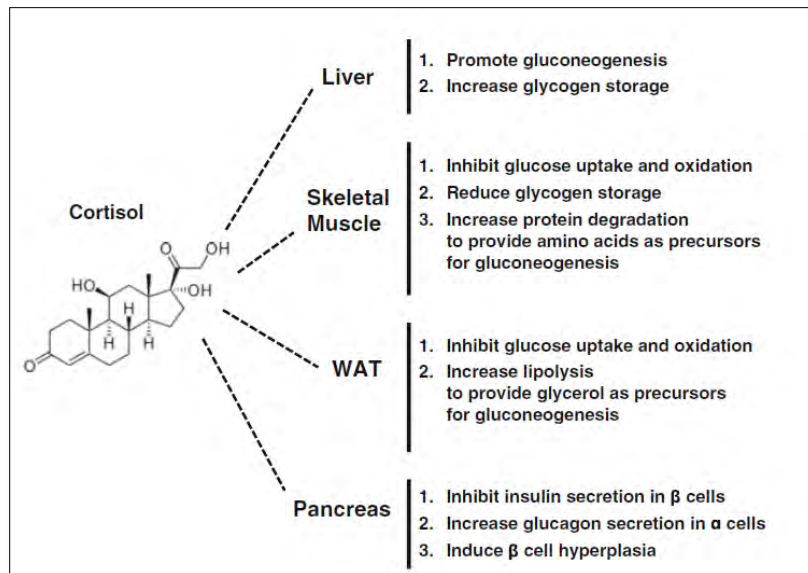
Γενικά υπάρχει η υπόθεση ότι οι αντι-φλεγμονώδεις δράσεις των γλυκοκορτικοειδών οφείλονται στους έμμεσους μηχανισμούς *trans*-καταστολής του GR, ενώ οι παρενέργειες σχετίζονται πιο πολύ με την *trans*-ενεργοποίηση. Η *trans*-ενεργοποίηση επάγει την έκφραση πολλαπλών γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα που εμπλέκονται σε μονοπάτια μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπιδίων. Έτσι, η ανεξέλεγκτη αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα αυτών των μορίων ίσως να συσχετίζεται με τις διαβητογενετικές δράσεις της χρόνιας θεραπείας με γλυκοκορτικοειδή. Από την άλλη μεριά, πιστεύεται ότι οι αντι-φλεγμονώδεις δράσεις της χρόνιας θεραπείας με γλυκοκορτικοειδή είναι απόρροια της *trans*-καταστολής του GR, καθώς όπως παρατηρήθηκε σε ποντίκια που έφεραν στο γονίδιο του GR μετάλλαξη που επηρέαζε την ικανότητα διμερισμού και σύνδεσής του στο DNA, ορισμένες φλεγμονώδεις διεργασίες μπορούσαν ακόμη να εξαλειφθούν. Η *trans*-καταστολή φλεγμονωδών γονιδίων-στόχων, συχνά περιλαμβάνει αλληλεπίδραση του μονομερούς GR με μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο NF-κB, ο CREB, το AP-1, το GATA3 και άλλα. Επειδή αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζουν την έκφραση φλεγμονωδών γονιδίων, η αλληλεπίδρασή τους με τον GR οδηγεί βαθμιαία στην καταστολή ενός μεγάλου αριθμού μεσολαβητών της φλεγμονής όπως κυτοκίνες, χημειοκίνες, ένζυμα και μόρια-σκαλωσιές.

Αντίθετα, η αντι-φλεγμονώδης ικανότητα του GR μέσω trans-καταστολής από άμεση αλληλεπίδραση με το DNA στα nGREs, παραμένει ακόμη άγνωστη (Vandevyver et al., 2013).

Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα όλο και περισσότερων μελετών δείχνουν ότι για την επίτευξη της πλήρους αντι-φλεγμονώδους δράσης των γλυκοκορτικοειδών απαιτείται και η trans-ενεργοποίηση από τον GR. Πιο ειδικά, με τη χρήση μικροσυστοιχιών αναγνωρίστηκαν γονίδια που επάγονται από τον GR και έχουν αντι-φλεγμονώδη δράση, όπως για παράδειγμα το γονίδιο που κωδικοποιεί για τον IκΒα, αναστολέα του NF-κΒ, γεγονός που καθιστά πιο πολύπλοκη και δύσκολη στην κατανόηση τη δράση των γλυκοκορτικοειδών έναντι της φλεγμονής (Vandevyver et al., 2013).

1.4 Γλυκοκορτικοειδή και μεταβολισμός γλυκόζης

Τα γλυκοκορτικοειδή ελέγχουν πολλαπλές εκφάνσεις του μεταβολισμού της γλυκόζης. Κατ' αρχάς, προάγουν τη διαδικασία της γλυκονεογένεσης στο ήπαρ, ενώ στους σκελετικούς μύες και τον λιπώδη ιστό μειώνουν την πρόσληψη και χρήση της γλυκόζης. Στο ήπαρ προάγουν τη γλυκονεογένεση κυρίως μέσω trans-ενεργοποίησης γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα της γλυκονεογενετικής οδού, όπως η καρβοξυκινάση του φώσφο-ενόλο-πυροσταφυλικού (PEPCK), η φωσφατάση της 1,6 διφωσφορικής φρουκτόζης, η φωσφατάση της 6-φωσφορικής φρουκτόζης και η 6-φώσφο-φρουκτοκινάση. Ένας ακόμη μηχανισμός προώθησης της γλυκονεογένεσης από τα γλυκοκορτικοειδή είναι η δημιουργία πρόδρομων μορίων της γλυκονεογένεσης μέσω καταβολισμού των πρωτεϊνών στους μύες που αποδίδουν αμινοξέα ως πρώτη ύλη. Επιπρόσθετα, ενισχύουν τη λιπόλυση στον λιπώδη ιστό, διαδικασία που οδηγεί στην απελευθέρωση γλυκερόλης και λιπαρών οξέων. Η γλυκερόλη χρησιμοποιείται σαν πρώτη ύλη για τη γλυκονεογένεση, ενώ τα λιπαρά οξέα προσφέρουν την απαραίτητη ενέργεια για την αναβολική αυτή διεργασία (Wang et al., 2015, chapter 5). Ωστόσο η δράση των γλυκοκορτικοειδών σε μύες και λιπώδη ιστό δεν περιορίζεται εκεί. Στον λιπώδη ιστό η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την PEPCK καταστέλλεται παρουσία των γλυκοκορτικοειδών, με αποτέλεσμα των αναστολή της γλυκονεογένεσης στον ιστό αυτό. Οι σκελετικοί μύες είναι υπεύθυνοι για την πλειοψηφία της γλυκόζης που προσλαμβάνεται με τη μεσολάβηση της ινσουλίνης. Η ινσουλίνη προωθεί τη μετακίνηση των μεταφορέων γλυκόζης GLUT4 στη μεμβράνη, δράση που καθιστά δυνατή την πρόσληψη της γλυκόζης από το κύτταρο. Τα γλυκοκορτικοειδή παρεμποδίζουν την εξαρτώμενη από ινσουλίνη πρόσληψη γλυκόζης, αλληλεπιδρώντας άμεσα με συστατικά του μονοπατιού σηματοδότησης της ινσουλίνης, όπως η κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου-3, η συνθετάση του γλυκογόνου και η διαδικασία μετατόπισης των GLUT4 στην κυτταρική μεμβράνη (Hwang et al., 2014). Σε συνδυασμό με τα παραπάνω, τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν και δρουν στο πάγκρεας, όπου με μηχανισμούς που δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένοι, επηρεάζουν την έκφραση ινσουλίνης και γλυκαγόνης. Η ινσουλίνη όπως είναι γνωστό, προάγει την πρόσληψη και χρήση της γλυκόζης από τα κύτταρα, ενώ δρα ανασταλτικά στη διαδικασία της γλυκονεογένεσης. Η γλυκαγόνη από την άλλη μεριά, προωθεί τη γλυκογονόλυση και τη γλυκονεογένεση. Άρα, τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλλουν την έκκριση ινσουλίνης και προωθούν την έκκριση γλυκαγόνης (Wang et al., chapter 5).



Εικόνα 5. Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης των γλυκοκορτικοειδών στο μεταβολισμό της γλυκόζης, έχοντας ως παράδειγμα την κορτιζόλη. Τα γλυκοκορτικοειδή δρουν τόσο στο πάγκρεας, όπου επηρεάζουν την έκκριση ορμονών σημαντικών για τη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης, όσο και στους σκελετικούς μύες και τον λιπώδη ιστό. Στους ιστούς αυτούς αποτέλεσμα της δράσης τους είναι η αποτροπή πρόσληψης και χρήσης της γλυκόζης, ενώ προωθούν και την αποικοδόμηση μορίων που θα αποτελέσουν πρώτη ύλη για τη βιοσύνθεση γλυκόζης στο ήπαρ (Wang et al., chapter 5).

Οι ενέργειες αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την παροδική αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα, που σε καταστάσεις στρες είναι κάτι το επιθυμητό. Ωστόσο, η χρόνια θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή οδηγεί σε ανεπαρκή έκκριση ινσουλίνης, σε υπεργλυκαιμία και τελικώς σε εμφάνιση διαβήτη τύπου II στον ασθενή. Παρόλα αυτά, η εξάλειψη της χρήσης των γλυκοκορτικοειδών δεν είναι μια ιδανική κατάσταση, καθώς ακόμα και στην περίπτωση του διαβήτη, η αντι-φλεγμονώδης δράση τους μπορεί να μειώσει την αντίσταση που παρουσιάζει ο οργανισμός στην ινσουλίνη. Εν κατακλείδι, η αναγνώριση προσεγγίσεων για το διαχωρισμό των μεταβολικών και αντι-φλεγμονωδών δράσεων των γλυκοκορτικοειδών θα μπορούσε να προσφέρει νέους τρόπους για τη θεραπεία μεταβολικών νόσων (Wang et al., chapter 5).

1.5 Γλυκοκορτικοειδή και κυτταρική επιβίωση ή απόπτωση

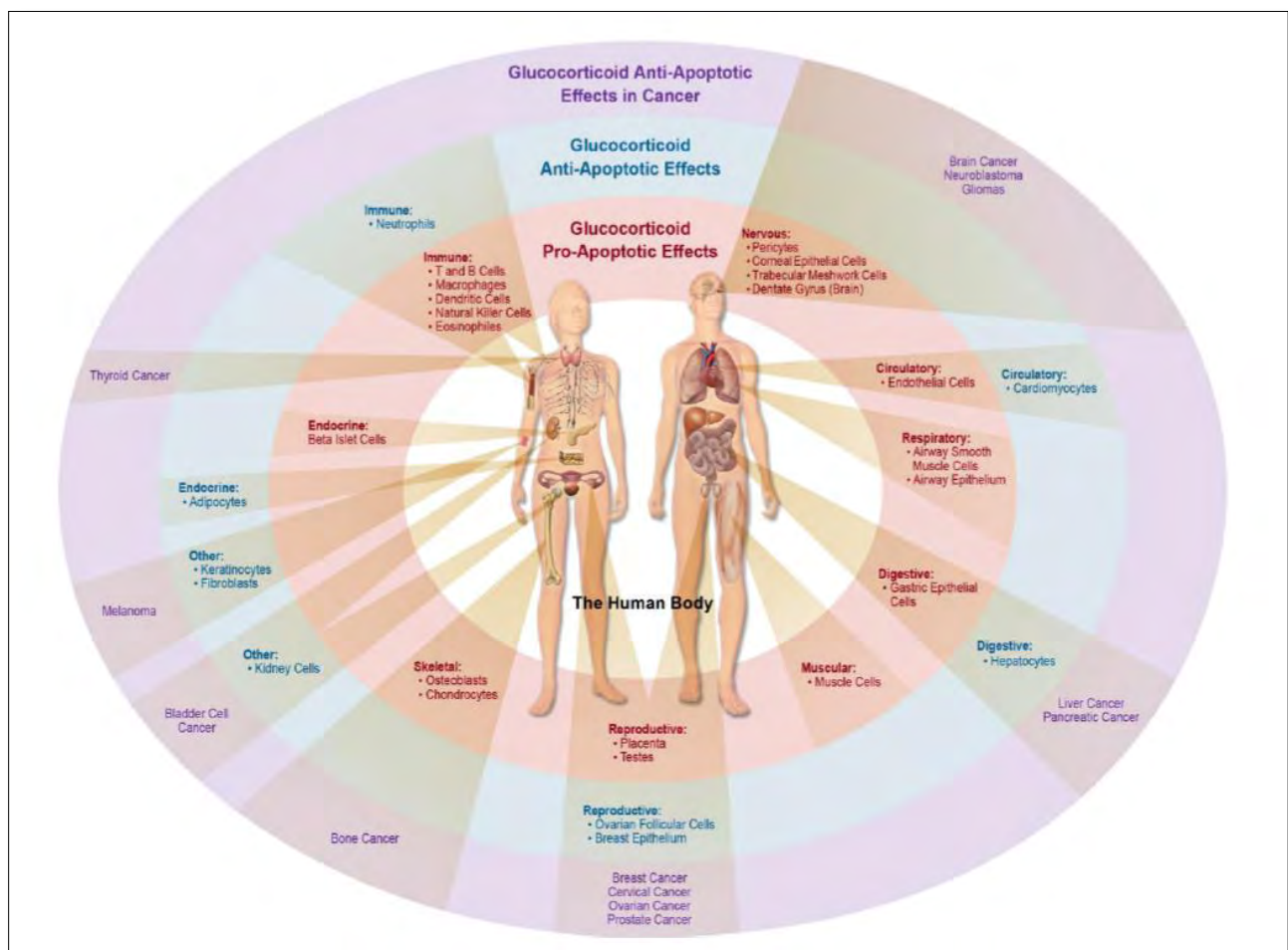
Η πλειάδα των διαφορετικών ισομορφών του GR εκφράζεται σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους και η δράση των γλυκοκορτικοειδών κρίνεται απαραίτητη για τη ζωή. Λόγω της ιδιαίτερα αποτελεσματικής αντι-φλεγμονώδους δράσης τους, τα γλυκοκορτικοειδή χορηγούνται ευρέως για την καταπολέμηση παθολογικών καταστάσεων. Ωστόσο, η παρατεταμένη χρήση τους στην κλινική πράξη μπορεί να επιφέρει ανεπιθύμητες ενέργειες στους ασθενείς, όπως η απόπτωση διαφόρων κυτταρικών τύπων. Παρά την ύπαρξη ενδείξεων ότι τα γλυκοκορτικοειδή επάγουν το εξωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης, ο κλασικός μηχανισμός της επαγόμενης από τον GR απόπτωσης περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του εσωτερικού μονοπατιού, που αφορά στην εμπλοκή των μιτοχονδρίων. Πιο ειδικά, τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν την έκφραση της πρωτεΐνης Bim, μέλος της οικογένειας των προ-αποπτωτικών μορίων Bcl-2, η οποία ενεργοποιεί τις προ-αποπτωτικές

πρωτεΐνες Bax/Bak που με τη σειρά τους δρουν στη μιτοχονδριακή μεμβράνη με σκοπό την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα. Η δράση αυτή ενεργοποιεί την κασπάση 9, μεταγενέστερα την κασπάση 3 και τελικώς επέρχεται απόπτωση. Εναλλακτικά τα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να οδηγήσουν σε υπερ-έκφραση προ-αποπτωτικών μορίων διαφορετικών της Bim, όπως οι πρωτεΐνες Bad και Puma ή στην υπο-έκφραση αντι-αποπτωτικών μορίων, όπως οι πρωτεΐνες Bcl-2 και Bcl-xL. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι ανάλογα με το μόριο-στόχο, τα γλυκοκορτικοειδή μπορεί να έχουν είτε προ- είτε αντι-αποπτωτική δράση κι αυτό εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο ή ιστό (Gruver-Yates et al., 2013).

Η παρατεταμένη χρήση γλυκοκορτικοειδών σε πολλά θεραπευτικά σχήματα, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη οστεοπόρωσης, λόγω της αντι-πολλαπλασιαστικής και προ-αποπτωτικής δράσης που ασκούν τα γλυκοκορτικοειδή στους οστεοκλάστες, κύτταρα υπεύθυνα για τον σχηματισμό των οστών, αλλά και της αποπτωτικής δράσης στα χονδροκύτταρα, δυσχεραίνοντας την ανάπτυξη των οστών. Περίσσεια γλυκοκορτικοειδών επίσης μπορεί να οδηγήσει σε μυοπάθειες, λόγω αύξησης του καταβολισμού των πρωτεϊνών στους μύες, αλλά και λόγω προαγωγής της απόπτωσης στα μυϊκά κύτταρα. Τα γλυκοκορτικοειδή, επίσης επάγουν την απόπτωση και σε άλλους τύπους μυών, πέρα από τους γραμμωτούς, όπως είναι οι λείοι μύες του αναπνευστικού συστήματος, αλλά και στο επιθήλιο του αεραγωγού με άμεσο επακόλουθο το άσθμα. Στην περίπτωση του κυκλοφορικού συστήματος, η παρουσία των γλυκοκορτικοειδών φαίνεται να προωθεί την απόπτωση ενδοθηλιακών κυττάρων των αιμοφόρων αγγείων, προκαλώντας υπέρταση. Τα υψηλά επίπεδα συνθετικών γλυκοκορτικοειδών μπορούν και διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, όπου και προκαλούν απόπτωση σε κύτταρα στην περιοχή του ιππόκαμπου. Τα όργανα του πεπτικού συστήματος περιλαμβάνουν το στόμα, τον οισοφάγο, το στομάχι, το λεπτό έντερο, το πάγκρεας, το ήπαρ, τη χοληδόχο κύστη και το κόλον. Από τα όργανα αυτά, τα κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης είναι επιρρεπή στην εξαρτώμενη από γλυκοκορτικοειδή απόπτωση. Παρόλο που τα γλυκοκορτικοειδή κατέχουν σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή, λίγα είναι γνωστά για την αποπτωτική ή μη δράση τους στο αναπαραγωγικό σύστημα. Σε αντίθεση με το αναπαραγωγικό, η αποπτωτική δράση των γλυκοκορτικοειδών στο ανοσοποιητικό σύστημα είναι πολύ καλά χαρακτηρισμένη και μάλιστα παρουσιάζουν μία πλειοτροπική δράση. Η εξαρτώμενη από γλυκοκορτικοειδή απόπτωση παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα γλυκοκορτικοειδή είναι σημαντικά για την επιλογή των T κυττάρων που ωριμάζουν, την ομοιόσταση του ανοσοποιητικού συστήματος και τον τερματισμό της ανοσοαπόκρισης μετά την κάθαρση της λοίμωξης. Οι αντιφλεγμονώδεις και ανοσορυθμιστικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών και η επαγόμενη από γλυκοκορτικοειδή απόπτωση έχουν οδηγήσει στη χρήση των γλυκοκορτικοειδών ως ανεκτίμητο μέρος της θεραπείας σε πολλές κλινικές συνθήκες. Οι υψηλές δόσεις γλυκοκορτικοειδών είναι γνωστό ότι προκαλούν απόπτωση στα θυμοκύτταρα, τα T κύτταρα, τα B κύτταρα, τα μακροφάγα, τα ώριμα αλλά όχι τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα, τα ηωσινόφιλα και τα natural killer cells. Είναι ενδιαφέρον ότι τα γλυκοκορτικοειδή έχουν την

αντίθετη επίδραση στα ουδετερόφιλα και στην πραγματικότητα προστατεύουν αυτά τα κύτταρα από την απόπτωση (Gruver-Yates et al., 2013).

Παρά το μεγάλο εύρος κυττάρων που είναι ευαίσθητα στην επαγόμενη από γλυκοκορτικοειδή απόπτωση υπάρχουν και κυτταρικοί τύποι όπου τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν αντι-αποπτωτική δράση. Εκτός από τα ουδετερόφιλα που αναφέρθηκαν ήδη, μελέτες έχουν δείξει μια αντι-αποπτωτική δράση των γλυκοκορτικοειδών στα κύτταρα του ωοθηκικού θυλακίου έναντι μιας ποικιλίας προ-αποπτωτικών ερεθισμάτων. Παρόμοια δράση παρατηρείται και σε κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης, αλλά και σε ηπατοκύτταρα και κύτταρα του λιπώδους ιστού, καθώς και σε κύτταρα της καρδιάς και των νεφρών (Gruver-Yates et al., 2013).



Εικόνα 6. Ιστο-ειδικές δράσεις των γλυκοκορτικοειδών στο ανθρώπινο σώμα, σε υγιή και καρκινικά κύτταρα (Gruver-Yates et al., 2013).

Τι συμβαίνει όμως στην περίπτωση του καρκίνου; Τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας και χορηγούνται για την αντιμετώπιση αιμοποιητικών καρκίνων, όπως η οξεία λεμφοβλαστική αναιμία, η χρόνια λεμφοβλαστική αναιμία, το πολλαπλό μυέλωμα, το λέμφωμα και μη του Hodgkin, λόγω της ικανότητάς τους να επιδρούν στην

πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και στη διαδικασία της απόπτωσης (Schlossmacher et al., 2011). Ωστόσο, η θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή στους καρκίνους έχει περιοριστεί από την εμφάνιση ανθεκτικότητας που παρατηρήθηκε σε κακοήγη λεμφοκύτταρα. Μερικοί καρκίνοι, όπως η λευχαιμία της μυελογενούς σειράς, είναι ενδογενώς ανθεκτικοί στη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή, ενώ άλλοι αναπτύσσουν αντίσταση μετά από παρατεταμένη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή ή μετά από υποτροπή και σε αυτή την περίπτωση σχετίζονται με κακή πρόγνωση. Οι μηχανισμοί που συμβάλλουν σε αυτή την παρατηρούμενη αντίσταση δεν είναι πλήρως ξεκάθαροι, αλλά φαίνεται να περιλαμβάνουν μεταβολές στο προφίλ έκφρασης των διαφορετικών ισομορφών του GR, μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης του GR, μεταλλάξεις στο γονίδιο του GR, απο-ρύθμιση προ- ή αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών ή αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις με διαφορετικές κινάσες (Gruver-Yates et al., 2013). Ειδικά για τα επίπεδα έκφρασης του GR, πειράματα σε λεμφοβλαστικούς καρκίνους προερχόμενους από ασθενείς δείχνουν ότι τα επίπεδα του υποδοχέα πρέπει να ξεπερνούν ένα συγκεκριμένο κατώφλι για να παρατηρείται ευαισθησία στη δράση των γλυκοκορτικοειδών (Schlossmacher et al., 2011). Παρόλο που οι μηχανισμοί αυτοί δεν αποτελούν αποκλειστικό χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων, η αντίσταση στα γλυκοκορτικοειδή έχει μελετηθεί κυρίως στους καρκίνους όπου τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν κομβικό σημείο της θεραπείας. Άλλοι καρκίνοι επιρρεπείς σε εμφάνιση αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή είναι το οστεοσάρκωμα και ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Gruver-Yates et al., 2013).

Σε συνδυασμό με τα παραπάνω, οι αντι-αποπτωτικές δράσεις και σε κάποιες περιπτώσεις οι προ-πολλαπλασιαστικές δράσεις που παρουσιάζουν τα γλυκοκορτικοειδή σε πολλούς τύπους συμπαγών καρκίνων θέτουν ένα μεγάλο ερωτηματικό όσον αφορά στη χρήση τους για θεραπεία πολλών καρκίνων. Στεροειδή, όπως η DEX, χορηγούνται σε συνδυασμό με χημειοθεραπευτικά σχήματα ή ακτινοθεραπείες πολλών καρκινικών κυτταρικών τύπων, καθώς μειώνουν τις παρενέργειες, ανακουφίζοντας τους ασθενείς (Gruver-Yates et al., 2013). Η θεραπεία με τα γλυκοκορτικοειδή αυξάνει την όρεξη, μειώνει την απώλεια βάρους και το αίσθημα κόπωσης, καθώς και την ναυτία και τάση προς έμετο (Lin et al., 2016). Το θεραπευτικό αποτέλεσμα πολλών συμπαγών όγκων και καρκίνων μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά από τη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου. Η DEX παρουσιάζει αντι-αποπτωτικές δράσεις σε μια ποικιλία κυτταρικών σειρών που προέρχονται από καρκίνο του μαστού, του εγκεφάλου, της μήτρας, των ωοθηκών, των οστών, καθώς και το μελάνωμα και το νευροβλάστωμα. Στην πλειοψηφία των κυττάρων αυτών η DEX φαίνεται να παρέχει προστασία στην απόπτωση που προσπαθούσε να προωθήσει το χημειοθεραπευτικό σχήμα. Σε καρκίνους του ουροδόχου κύστης, από τη μια η DEX παρείχε προστασία από την απόπτωση και προωθούσε την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, αλλά παράλληλα παρεμπόδιζε την πορεία της μετάστασης. Ωστόσο οι παρατηρήσεις αυτές δεν αντιστοιχούν μόνο σε πειράματα *in vitro*, αλλά και σε *in vivo*, καθώς καρκινικά παγκρεατικά κύτταρα που μεταφέρθηκαν σε ποντικούς σαν μόσχευμα κι στη συνέχεια τα ζώα εκτέθηκαν σε DEX, παρατηρήθηκε και πάλι αυτή η αντι-αποπτωτική δράση. Γενικά, σε ιστούς όπου τα γλυκοκορτικοειδή παρουσιάζουν μια κυτοπροστατευτική

δράση, το ίδιο παρατηρείται και στους καρκίνους που προέρχονται από αυτές τις κυτταρικές σειρές. Με βάση τα όσα αναφέρθηκαν, γίνεται αντιληπτό ότι πρέπει να πραγματοποιηθούν πολλές ακόμη έρευνες, τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, προκειμένου να ξεκαθαριστεί η εικόνα δράσης των γλυκοκορτικοειδών στο μονοπάτι της απόπτωσης στους διάφορους καρκίνους, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν με βεβαιότητα ή να απορριφθούν από τα χημειοθεραπευτικά σχήματα (Gruver-Yates et al., 2013).

1.6 Εκλεκτικοί ρυθμιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών-Selective Glucocorticoid Receptor Modulators (SEGRMs)

Από τις μέχρι τώρα ενότητες γίνεται αντιληπτό ότι τα γλυκοκορτικοειδή έχουν αμφίπλευρη δράση. Από τη μία, λόγω της φύσης και δράσης τους, αποτελούν σημαντικότατο όπλο των γιατρών σε πολλά θεραπευτικά σχήματα, από την άλλη όμως, η χρόνια χρήση τους επιβαρύνει τον ανθρώπινο οργανισμό με τρόπους ανεπιθύμητους. Η θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή έχει συσχετιστεί με ποικίλες παρενέργειες, όπως είναι η μυϊκή ατροφία, η αδυναμία επούλωσης των πληγών, η παρεμπόδιση της ανάπτυξης στα παιδιά, η οστεοπόρωση, ο καταρράκτης, το γλαύκωμα, οι διαταραχές στη συμπεριφορά, η υπεργλυκαιμία που οδηγεί σε ανάπτυξη διαβήτη, η νεφρική ανεπάρκεια, το πεπτικό έλκος και η γαστροεντερική αιμορραγία, η υπέρταση και ο αυξημένος κίνδυνος μολύνσεων (Sundahl et al., 2015). Επιπρόσθετα, σε πολλούς ασθενείς έπεται από χρόνια θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή, έχει παρατηρηθεί η ανάπτυξη ιστο-εξαρτώμενης αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή (Oakley et al., 2013). Όλες αυτές οι παρενέργειες φαίνεται να σχετίζονται με μακροχρόνια χρήση ή/και υψηλή δοσολογία των γλυκοκορτικοειδών. Ουσιαστικά, αυτό που παρατηρείται ως αρνητικό, για τον οργανισμό δεν είναι άλλο από τις φυσιολογικές δράσεις των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών, μόνο που εδώ φαίνεται να έδρασαν πιο έντονα ή παρατεταμένα ή ξεκίνησαν και συνεχίστηκαν σε λάθος στιγμή του κirkάδιου ρολογιού. Ωστόσο, η πλήρης εγκατάλειψη αυτών των μορίων από την ιατρική πρακτική δεν είναι κάτι το επιθυμητό. Κύριο μέλημα είναι να ελαχιστοποιηθούν, εάν όχι να εξαλειφθούν, οι παρενέργειες και να βελτιστοποιηθούν οι θετικές επιδράσεις των γλυκοκορτικοειδών, βλέψεις που αποτελούν σημαντική πρόκληση. Για το λόγο αυτό, τις τελευταίες δεκαετίες έντονο ενδιαφέρον προς μελέτη, παρουσιάζουν ενώσεις που χαρακτηρίζονται ως εκλεκτικοί αγωνιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Selective Glucocorticoid Receptor Agonists, SEGRAs) και ρυθμιστές του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Selective Glucocorticoid Receptor Modulators, SEGRMs). Οι ενώσεις αυτές φαίνεται να διατηρούν την αντιφλεγμονώδη δράση των γλυκοκορτικοειδών, χωρίς όμως τις τόσο σοβαρές παρενέργειες (Sundahl et al., 2015).

Όπως περιγράφηκε προηγουμένως, υπάρχει η υπόθεση ότι οι αντι-φλεγμονώδεις δράσεις των γλυκοκορτικοειδών οφείλονται κατά μεγάλο μέρος στους μηχανισμούς *trans*-καταστολής του GR, ενώ οι μηχανισμοί *trans*-ενεργοποίησης του GR χρεώνονται την εμφάνιση των περισσότερων παρενεργειών από τη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή. Ωστόσο, αυτή η υπόθεση με τα χρόνια αποδείχθηκε πολύ απλοϊκή. Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι

ορισμένες παρενέργειες, όπως η υπεργλυκαιμία και η μυϊκή εξασθένηση, προωθούνται κυρίως από την trans-ενεργοποίηση, ενώ άλλες, όπως η καταστολή του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια, προκύπτουν από την trans-καταστολή. Υπάρχουν όμως κι εκείνες οι παρενέργειες, όπως η οστεοπόρωση, που είναι απόρροια και των δύο μηχανισμών. Παρόλα αυτά, υπάρχουν παραδείγματα προσδετών του GR, οι οποίοι επάγουν εκλεκτικά την trans-καταστολή ως προς την trans-ενεργοποίηση και γι' αυτό το λόγο μακροπρόθεσμα ο κίνδυνος εμφάνισης συστημικών παρενεργειών μπορεί να μειωθεί, ενώ ταυτόχρονα διατηρούνται και οι αντι-φλεγμονώδεις δράσεις. Τέτοιες ενώσεις που ενεργοποιούν συγκεκριμένους μηχανισμούς του GR κι έτσι μπορούν να μεταβάλλουν το προφίλ των εξαρτώμενων από τον GR γονιδίων που θα εκφραστούν, είναι οι SEGRAs ή SEGRMs. Ο όρος SEGRAs χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει την πρώτη γενιά μορίων που παρουσίαζαν μια αγωνιστική δράση ως προς τους μηχανισμούς trans-ενεργοποίησης του GR, ενώ ο όρος SEGRMs εφαρμόστηκε για να διαχωρίσει τη νέα γενιά ενώσεων από τις παλαιότερες (Sundahl et al., 2015).

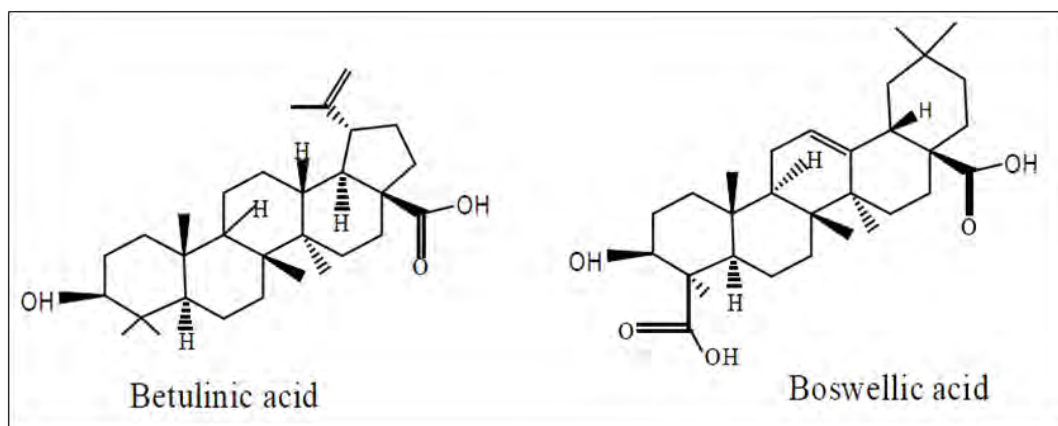
Ένα από τα πιο μελετημένα SEGRMs είναι η φυτικής προέλευσης ένωση A (Compound A, Cp dA). Το μόριο αυτό έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* και φαίνεται να ευνοεί τους trans-κατασταλτικούς μηχανισμούς του GR έναντι της trans-ενεργοποίησης. Παρουσιάζει λιγότερες παρενέργειες και είναι εξίσου αποτελεσματικό με τη DEX όσο αφορά την αντι-φλεγμονώδη δράση σε μοντέλα ποντικών για το άσθμα, την αρθρίτιδα και την αυτοάνοση εγκεφαλίτιδα (Gruver-Yates et al., 2013). Ωστόσο, λόγω της μεγάλης του ανθεκτικότητας και του στενού θεραπευτικού εύρους που παρουσιάζει, κρίνεται ακατάλληλο για την εφαρμογή του σε ασθενείς, αλλά είναι εξαιρετικό εργαλείο για ερευνητικούς σκοπούς (Sundahl et al., 2015).

1.7 Τριτερπενοειδή και SEGRMs

Τα τερπένια ανήκουν στην οικογένεια των φυτοστερολών και συναντώνται σε πληθώρα ζωντανών οργανισμών, προκαρυωτικών αλλά και ευκαρυωτικών. Ωστόσο, συγκριτικά με τους λοιπούς οργανισμούς, οι ενώσεις αυτές στα φυτά φαίνεται να είναι πιο άφθονες και πιο λειτουργικές (Cháirez-Ramírez et al., 2016). Στη δομή τους είναι υδρογονάνθρακες, αποτελούμενοι από μονάδες ισοπρενίου (C_5H_8) και με βάση των αριθμό επανάληψης αυτών των μονάδων, ταξινομούνται σε ημι-, μονο-, σεσκι-, δι-, τρι-, τετρα- και πολύ-τερπένια. Οι τροποποιημένες μορφές των τερπενίων, που φέρουν κι άλλες λειτουργικές ομάδες στον σκελετό τους, καλούνται τερπενοειδή (Ali Shah et al., 2014, Patlolla et al., 2012). Από τις πιο ενδιαφέρουσες ομάδες τερπενίων είναι τα τριτερπένια (Cháirez-Ramírez et al., 2016). Τα τριτερπένια φέρουν στο σκελετό τους 6 μονάδες ισοπρενίου, άρα 30 άτομα άνθρακα, με το πιο απλό τριτερπένιο να είναι το σκουαλένιο, που αποτελεί και την πρόδρομη ένωση για μια δομικά ποικίλη ομάδα φυσικών προϊόντων, που εμφανίζουν σχεδόν 200 διαφορετικούς σκελετούς (Ali Shah et al., 2014). Οι πιο κοινές δομές των τριτερπενοειδών είναι πεντακυκλικές, όπως είναι οι ολενάνες (oleananes), οι ουρσάνες (ursanes,) και οι λουπάνες (lupanes), αλλά και τετρακυκλικές, όπως οι δαμαράνες (dammarane) και οι ευφάνες

(euphanes). Τα τριτερπένια συχνά αναγνωρίζονται ως βιοενεργές ενώσεις και υποβάλλονται σε πολλαπλές φυτοχημικές και φαρμακολογικές μελέτες (Cháirez-Ramírez et al., 2016). Γενικά, λόγω της κυτοτοξικής τους δράσης σε ποικίλες καρκινικές κυτταρικές σειρές, τα πεντακυκλικά τριτερπένια θεωρούνται ελπιδοφόροι αντι-καρκινικοί παράγοντες. Ωστόσο, χάρη στις πολλαπλές φαρμακευτικές τους ικανότητες, οι οποίες περιλαμβάνουν αντι-αγγειογεντικές, αντι-φλεγμονώδεις, καθώς και αντι-οξειδωτικές δράσεις, σε συνδυασμό με την ικανότητά τους να ενισχύουν την κυτταρική διαφοροποίηση, είναι πολλά παραπάνω από απλοί κυτοτοξικοί παράγοντες και αποτελούν πολύ καλό υπόστρωμα για τις πιο σύγχρονες στρατηγικές αντιμετώπισης τους καρκίνου (Laszczyk, 2009).

Οι ιδιότητες αυτές των πεντακυκλικών τριτερπενοειδών, σε συνδυασμό με τη δομική ομοιότητα που παρουσιάζουν με τα γλυκοκορτικοειδή, λόγω του δακτυλίου της χοληστερόλης στον σκελετό τους, τα καθιστούν πολύ καλό υπόστρωμα για τη διερεύνηση της πιθανής τους δράσης ως SEGRMs. Αυτός ήταν και ο στόχος της παρούσας εργασίας, όπου το ενδιαφέρον εστιάστηκε σε ημι-συνθετικά παράγωγα των πεντακυκλικών τριτερπενοειδών μπετουλινικό (betulinic) και μποςβελλικό οξύ (boswellic acid), προκειμένου να διερευνηθεί εάν ασκούν τις δράσεις τους μέσω του GR.



Εικόνα 7. Χημική δομή των πεντακυκλικών τριτερπενοειδών μπετουλινικό (betulinic) και μποςβελλικό οξύ (boswellic acid) (Patlolla et al., 2012).

Το μπετουλινικό οξύ (betulinic acid) ή 3β-υδρόξυ-λουπ-20(29)-εν-28-οϊκό οξύ, αποτελεί ένα πεντακυκλικό τριτερπενοειδές προερχόμενο από τη λουπάνη (lupane-type triterpenoid), ευρέως διαδεδομένο σε φαρμακευτικά φυτά. Παρουσιάζει μια σειρά φαρμακολογικών δράσεων όπως είναι η αντι-ιική δράση, ιδίως έναντι του HIV, η κυτοτοξική κι αντι-καρκινική του δράση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον όμως παρουσιάζουν και οι αντι-διαβητικές, αντι-υπερλιπιδικές και αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητές του. Γενικά, το μπετουλινικό οξύ έχει περιγραφεί ως πιθανός αντι-διαβητικός παράγοντας για την αντιμετώπιση του διαβήτη τύπου II (Ríos et al., 2017).

Αρχικά, πειράματα τόσο in vitro όσο και in vivo έδειχναν ότι το μπετουλινικό οξύ επάγει σε σημαντικό βαθμό απόπτωση σε κύτταρα του μελανώματος. Ωστόσο, μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί κι άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές προερχόμενες από ποικίλες κακοήθειες, όπως είναι η λευχαιμία, ο καρκίνος του μαστού, των ωοθηκών, του προστάτη, των πνευμόνων και

του κόλον, που είναι ευαίσθητες στην παρουσία του μπετουλινικού οξέος (Mullauer et al., 2009). Μάλιστα θεωρείται ότι υπάρχει μια επιλεκτική ευαισθησία μεταξύ των κακοηθών σειρών, καθώς, ενώ παρατηρείται κάποια κυτοτοξικότητα του μπετουλινικού οξέος σε πρωταρχικές κυτταρικές σειρές, η συγκέντρωση που απαιτείται για την εκδήλωση της τοξικότητας φαίνεται να είναι υψηλότερη από εκείνη που απαιτείται στις αντίστοιχες καρκινικές κυτταρικές σειρές (Laszczyk, 2009). Έχουν γίνει εκτεταμένες μελέτες για την αποσαφήνιση του μηχανισμού επαγωγής της απόπτωσης από το μπετουλινικό οξύ και δεν βρέθηκαν ενδείξεις επαγωγής του εξωτερικού μονοπατιού (Mullauer et al., 2009). Ωστόσο, βρέθηκε ότι επάγει την απόπτωση μέσω του εσωτερικού μονοπατιού, επηρεάζοντας το δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης, οδηγώντας στην έξοδο του κυτοχρώματος C στο κυτταρόπλασμα, στην ενεργοποίηση των κασπασών και της PARP και ακόμη, προωθεί την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Mullauer et al., 2009, Laszczyk, 2009). Σε επίπεδο μορίων, μελέτες δείχνουν ότι το μπετουλινικό οξύ προωθεί τη μιτοχονδριακή απόπτωση μη αλληλεπιδρώντας με τα μόρια της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2, Bax και Bak, μόρια που κατέχουν σημαντικό ρόλο στην έξοδο του κυτοχρώματος C από το μιτοχόνδριο και στην επακόλουθη ενεργοποίηση των κασπασών. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε όταν η ομάδα του Mullauer, επώασε με μπετουλινικό οξύ καρκινικές κυτταρικές σειρές που δεν εκφράζουν τα δύο αυτά μόρια και μέσω ανάλυσης κατά western, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα ενεργοποιημένης PARP και κασπάσης 3 ήταν παρόμοια με τα αντίστοιχα επίπεδα σε wild type καρκινικά κύτταρα που επώαστηκαν εξίσου με μπετουλινικό οξύ (Mullauer et al., 2009).

Σε πειράματα για την αντι-φλεγμονώδη δράση του, παρατηρήθηκε μείωση της προκαλούμενης από ποικίλους παράγοντες φλεγμονής σε ικανοποιητικό βαθμό, ενώ μπορεί να συμβάλει και στην πρόληψη της φλεγμονής των αγγείων και της αθηροσκλήρωσης (Ríos et al., 2017). Αποτελέσματα πειραμάτων δείχνουν ότι το μπετουλινικό οξύ μπορεί να αναστείλει τη δράση της φωσφολιπάσης A, μορίου που παρέχει υποστρώματα στην κυκλο-οξυγενάση και την 5-λιπο-οξυγενάση, μονοπάτια με κομβικό ρόλο στην έκβαση της φλεγμονώδους διαδικασίας. Ακόμη, η κυκλο-οξυγενάση 2 και το προϊόν της, η προσταγλανδίνη E2, επίσης φαίνεται να αναστέλλονται από το μπετουλινικό οξύ. Να σημειωθεί ότι η έκφραση της κυκλο-οξυγενάσης 2 ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ, γεγονός που υποδεικνύει μια ανασταλτική επίδραση του μπετουλινικού οξέος στον μεταγραφικό αυτόν παράγοντα. (Laszczyk, 2009). Ωστόσο, λόγω της φύσης του δεν είναι διαλυτό σε νερό. Για τη διαλυτοποίησή του απαιτούνται οργανικοί διαλύτες, οι οποίοι θέτουν περιορισμούς ως προς το εύρος των συγκεντρώσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο σε in vitro όσο και σε in vivo μελέτες (Ríos et al., 2017).

Το μπουσβελλικό οξύ (boswellic acid) συναντάται σε ανώτερα φυτά, του είδους *Boswellia* και προέρχεται από την ουρσάνη (ursane) (Poeckel et al., 2006, Patlolla et al., 2012). Ανήκει και αυτό στην κατηγορία των πεντακυκλικών τριτερπενοειδών και διακρίνεται στις διαμορφώσεις α και β, ανάλογα με το αν δύο μεθυλομάδες σχηματίζουν δεσμό μόνο με τον άνθρακα 20 ή αν γειτονεύουν, καθώς το ένα μεθύλιο μπορεί να συνδέεται με τον άνθρακα 19 και το άλλο με τον άνθρακα 20. Εκχυλίσματα μπουσβελλικού οξέος ή μεμονωμένα μπουσβελλικά οξέα παρουσιάζουν φαρμακολογικές ιδιότητες με πιθανό δυναμικό δράσης ως

θεραπευτικά μέσα για χρόνιες φλεγμονώδεις νόσους, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η οστεοαρθρίτιδα, αλλά και για περιπτώσεις καρκίνου, υπερ-λιπιδαιμίας και υπερ-χοληστερολαιμίας. Μελέτες δείχνουν ότι τα μπουσβελλικά οξέα, με πιο αποτελεσματικό το 3-O-ακέτυλ-11-κέτο-μποςβελλικό οξύ ή αλλιώς AKBA, παρεμποδίζουν τη σύνθεση λευκοτριενίων στα ουδετερόφιλα αρουραίων. Τα λευκοτριένια είναι πιθανοί μεσολαβητές της φλεγμονής και των αλλεργιών, γι' αυτό και η 5-λιπο-οξυγενάση που παίζει καθοριστικό ρόλο στη βιοσύνθεσή τους, φαίνεται να αποτελεί στόχο των μπουσβελλικών οξέων με αποτέλεσμα την αναστολή του συγκεκριμένου ενζύμου. Ωστόσο, ο μηχανισμός δράσης τους δεν φαίνεται να περιορίζεται μόνο στη λιπο-οξυγενάση ως μοριακό στόχο, καθώς και η ανθρώπινη ελασάση των λευκοκυττάρων βρέθηκε ότι αναστέλλεται παρουσία μπουσβελλικών οξέων. Ένα ακόμη μονοπάτι που φαίνεται να αναστέλλεται παρουσία των μπουσβελλικών οξέων είναι αυτό του NF-κΒ, μέσω καταστολής της ενεργοποίησης της IKK (Poeckel et al., 2006).

Ακόμη, μελέτες σε καρκινικές κυτταρικές σειρές από το κόλον δείχνουν ότι η παρουσία του μπουσβελλικού οξέος μπλοκάρει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, μέσω επαγωγής της p21, μείωσης της έκφρασης των κυκλινών D1 και E και φωσφοριλύωσης των Rb, CDK2 και CDK4, ενώ σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης βρέθηκε ότι το μπουσβελλικό οξύ ενεργοποιεί γονίδια που σχετίζονται με την παύση του κυτταρικού κύκλου. Όσον αφορά στις αποπτωτικές του δράσεις, αυτές έχουν παρατηρηθεί σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μυελώδους λευχαιμίας και κόλον (Patlolla et al., 2012). Πολλές μελέτες διεξήχθησαν προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός με τον οποίο επάγει την απόπτωση. Ένας κύριος μεσολαβητής είναι η κασπάση 8, αλλά παρόλο που η κασπάση 8 σχετίζεται με το εξωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης, δεν βρέθηκε συσχέτιση του μπουσβελλικού οξέος με τον Fas ή τον υποδοχέα του. Ωστόσο, αμφιλεγόμενα είναι και τα αποτελέσματα σχετικά με την επαγωγή προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών. Σε αποπτωτικές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές μυελογενούς λευχαιμίας που εφαρμόστηκαν μπουσβελλικά οξέα, τα επίπεδα των αντι-αποπτωτικών μορίων Bcl-2 και Bcl-XL, αλλά και του προ-αποπτωτικού μορίου Bax, δεν είχαν μεταβληθεί. Δεν συνέβη το ίδιο όμως με τα πρωτεολύματα του προ-αποπτωτικού μορίου Bid. Η ενεργοποιημένη μορφή της Bid οδήγησε σε μείωση της διαπερατότητας της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης, αλλά όχι μέσω της p53 ή της κασπάσης 9. Αντίθετα, σε άλλη καρκινική σειρά, η εφαρμογή του μπουσβελλικού οξέος, οδήγησε σε μείωση των μορίων Bcl-2 και Bcl-XL (Poeckel et al., 2006).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Αντιδραστήρια

2.1.1.1 Χημικά Αντιδραστήρια

- i. Εντός του χώρου των κυτταροκαλλιιεργειών:
 - ✓ Αιθανόλη (EtOH): Sigma
 - ✓ Βιοαιθανόλη: Kalochem
 - ✓ Πενικιλίνη-Στρεπταμυκίνη: Life Technologies-Invitrogen
 - ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων 5x ή Lysis Buffer 5x: Promega
 - ✓ Dexamethasone (DEX): Riedel-de Haën
 - ✓ Dimethyl sulfonyl Chloride (DMSO): Sigma
 - ✓ Dulbecco's modified eagle medium DMEM 4,5 g/l Glucose Gibco®: Life Technologies-Invitrogen, Sigma
 - ✓ Dulbecco's modified eagle medium DMEM without phenol red Gibco® 4,5 g/l Glucose: Life Technologies-Invitrogen
 - ✓ Fetal Bovine Serum (FBS) Gibco®: Life Technologies-Invitrogen
 - ✓ Charcoal Stripped Fetal Bovine Serum Gibco®: Life Technologies-Invitrogen
 - ✓ L-Glutamine: Life Technologies-Invitrogen
 - ✓ Lipofectamine® 2000: Life Technologies-Invitrogen
 - ✓ Opti-MEM®: Life Technologies-Invitrogen
 - ✓ PBS 10x: Gibco
 - ✓ Trypsin-EDTA 5% 10x: Gibco, Sigma
- ii. Εκτός του χώρου των κυτταροκαλλιιεργειών:

✓ Acrylamide/Bis acrylamide 40% (Bio-Rad)	✓ Na ₂ CO ₃ : Merck
✓ Ammonium Persulfate (APS): Sigma	✓ NaOH: Merck
✓ ATP: Sigma	✓ o-Nitrophenyl β-D-galactoside (ONPG): Sigma
✓ Bradford protein assay: Bio-rad	✓ Phenyl methyl Sulfonyl Floride (PMSF): SERVA
✓ Developer-Fixer: Carestream	✓ Protease Inhibitors: Sigma
✓ Dithiothreitol (DTT): SERVA	✓ Sodium dodecyl Sulfate (SDS): Sigma
✓ ddH ₂ O: Βιοσέπ	✓ Skimmed milk powder: Regilait
✓ ECL A & B: Santa Cruz	✓ TEMED: Research Organics, Applichem
✓ EDTA: Serva	✓ Tris base: Merck, Serva
✓ KCl: Merck	✓ Tween 20 (Euroclone, Sigma)
✓ KH ₂ PO ₄ : Merck	✓ β-μερκαπτοαιθανόλη: Riedel-de Haën
✓ MgCl ₂	✓ Γλυκίνη: AppliChem
✓ MgSO ₄	✓ Ισοπροπανόλη: Sigma
✓ Na ₂ HPO ₄ : Merck	✓ Κυανούν της βρωμοφαινόλης: Fluca
✓ NaH ₂ PO ₄ : Applichem	
✓ NaCl: Panreac	

- ✓ Λουσιφερίνη
- ✓ Μάρτυρας μοριακών μεγεθών πρωτεϊνών: ThermoScientific Fermentas
- ✓ Μεθανόλη: Sigma
- ✓ Συνένζυμο-A: Applichem Panreac

2.1.1.2 Ουσίες

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν aliquots των 10 mM των εξής ουσιών:

Παράγωγα του μπετουλινικού οξέος (betulinic acid): PCUPO 004, PCUPO 012, FR 381

Παράγωγα του μποσβελλικού οξέος (boswellic acid): TFC 001, TFC 002, TFC 010, TFC 011, TFC 012, TFC 013

Διαλύτης των ουσιών ήταν το DMSO.

2.1.1.3 Αντισώματα

2.1.1.3.1 Πρωτογενή Αντισώματα

- ✓ Αντίσωμα έναντι α-τουμπουλίνης από επίμυ, 1:500
- ✓ Αντίσωμα έναντι β-ακτίνης από επίμυ (SigmaAldrich), 1:5.000
- ✓ Αντίσωμα έναντι PEPCK από κόνικλο (Santa Cruz), 1:2.500
- ✓ Αντίσωμα έναντι GR H-300 από κόνικλο (Santa Cruz), 1:1.000
- ✓ Αντίσωμα έναντι προ-κασπάσης 9 από ποντικό (Cell Signaling 9508), 1:500
- ✓ Αντίσωμα έναντι προ-κασπάσης 3 από κόνικλο (Abcam), 1:4.000

→ Διαλυμένα σε PBST×1 και 2% γάλα

2.1.1.3.2 Δευτερογενή Αντισώματα

- ✓ Αντίσωμα έναντι mouse IgG-HRP (Pierce), 1:50.000
- ✓ Αντίσωμα έναντι rabbit IgG-HRP (Pierce), 1:50.000

→ Διαλυμένα σε PBST×1 και 2% γάλα

2.1.1.4 Διαλύματα

- **Dexamethasone (DEX):** Διαλύεται σε EtOH 100% και φυλάσσεται στους -20 °C. Το stock aliquot έχει συγκέντρωση 10^{-3} M.
- **DTT 1M:** Για 10 ml, διαλύονται 1,54 gr DTT 1M σε ddH₂O. Φύλαξη στους -20 °C.
- **PMSF 200 mM:** Με αραιώση 10% σε ισοπροπανόλη παρασκευάζονται διαλύματα PMSF συγκέντρωσης 20 mM. Φύλαξη στους -20° C.
- **Διάλυμα λύσης κυττάρων (Buffer A):** Αποτελείται από 20 mM Tris pH 7.5, 0.5% Triton-X-100, 250 mM NaCl και 3 mM EDTA. Φυλάσσεται στους 4 °C. Για κάθε 1ml από το παραπάνω διάλυμα προστίθενται επιπλέον 0,5 μl PMSF 200 mM, 2 μl DTT 1M και 10 μl Protease Inhibitors. Φύλαξη στους 4 °C.
- **Διάλυμα Bradford:** Stock 5×. Χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 1×, αραιωμένο με ddH₂O. Η αναλογία του χρησιμοποιούμενου όγκου από το δείγμα πρωτεϊνών προς τον όγκο του διαλύματος Bradford είναι 1:1000.
- **Tris-HCl 1.5 M pH 8.8:** Για την παρασκευή 0.2 l διαλύματος ζυγίζονται 36,342 gr Tris τα οποία διαλύονται σε dH₂O. Το pH ρυθμίζεται στο 8.8 με προσθήκη HCl 12 M και συμπληρώνεται ο όγκος με dH₂O. Αποθηκεύεται στους 4 °C.
- **Tris 20 mM pH 7.5:** Αραιώση stock διαλύματος Tris 1 M pH 7.5 σε ddH₂O. Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου.

- **APS 10%:** Παρασκευάζεται διαλύοντας 0,00X g APS σε X00 ml ddH₂O. Αποθηκεύεται στους -20 °C.
- **Sample Buffer 4x:** Περιέχει 1M Tris pH 6.8, 10% γλυκερόλη, 10% SDS, 5% β-μερκαπτοαιθανόλη, 1% κυανού της βρωμοφαινόλης. Φυλάσσεται στους -20 °C.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10x:** Για διάλυμα 1 l, ζυγίζονται 30.3 gr Tris base και 144.00 gr γλυκίνης τα οποία διαλύονται σε ddH₂O. Δεν ρυθμίζεται το pH του διαλύματος και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 1x:** Αποτελείται από Running Buffer 10x και dH₂O σε αναλογία όγκων 1:9. Στο διάλυμα προστίθεται και SDS σε αναλογία 0.1 %. Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10x:** Αποτελείται από 10% Running Buffer 10x, 20% μεθανόλη και 0.05% SDS. Ο όγκος συμπληρώνεται με προσθήκη dH₂O. Αποθηκεύεται στους 4 °C.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10x:** Για ποσότητα 1l, ζυγίζονται: 2 g KCl, 80 g NaCl, 17,8 g Na₂HPO₄, 2,4 g KH₂PO₄. Φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα PBST 1x:** Αποτελείται από PBS 10x και dH₂O ή ddH₂O, σε αναλογία όγκων 1:9. Στο διάλυμα προστίθεται Tween-20 σε αναλογία 1%. Αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **Διάλυμα για εμφάνιση σήματος:** Αποτελείται από ένα διάλυμα ανάπτυξης σήματος (Developer solution) και ένα διάλυμα μονιμοποίησης σήματος (Fixer solution). Το εκάστοτε διάλυμα παρασκευάζεται με αραιώση 1:3,5 v/v από το αντίστοιχο διάλυμα (Developer ή Fixer) σε dH₂O.
- **Διάλυμα Na₂HPO₄ 0.2M:** Για 100 ml, διαλύονται 3,55 g Na₂HPO₄ 2H₂O σε ddH₂O
- **Διάλυμα NaH₂PO₄ 0.2M:** Για 100 ml, διαλύονται 2,02 g NaH₂PO₄ 2H₂O σε ddH₂O
- **Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.1M pH 7.5:** Για 100 ml, αναμειγνύονται 41 ml 0.2M Na₂HPO₄ 2H₂O και 9 ml 0.2M NaH₂PO₄ σε 50 ml ddH₂O
- **ONPG:** Διαλύεται κατάλληλη ποσότητα σκόνης σε διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.1M pH 7.5, ώστε η τελική συγκέντρωση να αντιστοιχεί σε 4 mg/ml. Φύλαξη στους -20 °C.
- **Αντιδραστήριο Λουσιφεράσης:** Σε ddH₂O διαλύονται τα εξής: Tris 1M (τελική συγκέντρωση 20 mM), MgSO₄ (2.67 mM), EDTA (0.1M), DTT (33.3 mM), συνένζυμο-A (270 μM), λουσιφερίνη (470 μM) και ATP (530 μM). Το αντιδραστήριο αυτό είναι φωτοευαίσθητο. Αποθηκεύεται στους -20 °C.

2.1.2 Πλασμιδιακοί Φορείς

Χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς pMMTV-GRE-Luc και pSV40-β-Gal για πειράματα παροδικής διαμόλυνσης ευκαρυωτικών κυττάρων.

2.1.3 Βακτηριακά Στελέχη

Χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος Escherichia Coli DH5αTM (Life Technologies-Invitrogen) για τον πολλαπλασιασμό των παραπάνω πλασμιδιακών φορέων.

2.1.4 Κυτταρικές σειρές

Η πρώτη ύλη για όλες τις πειραματικές διαδικασίες που εφαρμόστηκαν στην παρούσα εργασία ήταν οι καρκινικές κυτταρικές σειρές που περιγράφονται παρακάτω.

HeLa: επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας, ανθρώπινης προέλευσης. Μετρίως δεκτικά σε τεχνικές διαμόλυνσης.

HepG2: επιθηλιακά ηπατικά καρκινικά κύτταρα, ανθρώπινης προέλευσης. Επιδέχονται διαμόλυνση

HEK 293: εμβρυακά επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα του νεφρού, ανθρώπινης προέλευσης. Πολύ δεκτικά σε τεχνικές διαμόλυνσης.

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο DMEM 4,5 g glucose, εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% 200mM L-γλουταμίνη (L-Glut) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (P/S) σε επωαστικό κλίβανο, στους 37°C, σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5.0 % CO₂. 48-72 ώρες πριν την κατεργασία των κυττάρων με τις προς μελέτη ουσίες, τα κύτταρα καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο DMEM 4,5 g glucose, χωρίς τον δείκτη κόκκινο της φαινόλης (DMEM without phenol red), εμπλουτισμένο με 10% FBS κατεργασμένο με ενεργό άνθρακα για την απομάκρυνση των στεροειδών ορμονών, 1% 200mM L-γλουταμίνη (L-Glut) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (P/S).

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Ανοσοκυτταροχημεία

Ημέρα 0: Μέτρηση και στρώσιμο κυττάρων σε 24×well plate με πλήρες DMEM without phenol red, παρουσία καλυπτριδών.

HeLa → 10.000 κύτταρα/well (παράγωγα μπετουλινικού οξέος)

Ημέρα 2: Προσθήκη ουσιών, μονιμοποίηση των κυττάρων και επώαση με αντισώματα

i. Προσθήκη ουσιών

Μελετήθηκαν οι ουσίες PCUPO 004, PCUPO 012 και FR 381 σε τελική συγκέντρωση 10 μM και η δράση τους συγκρίθηκε με τη δράση της DEX, τελικής συγκέντρωσης 10⁻⁶ M, παρουσία πλήρους DMEM without phenol red. Η επώαση διήρκεσε 2 ώρες.

ii. Μονιμοποίηση των κυττάρων και επώαση με αντισώματα

Μετά το πέρας των 2 ωρών επώασης με τις ουσίες, τα κύτταρα κατεργάζονται με μεθανόλη για 20 λεπτά στους -20 °C, προκειμένου να μονιμοποιηθούν πάνω στις καλυπτρίδες. Αφού ακολουθήσουν εκπλύσεις με κρύο PBS 1x, εφαρμόζεται για μία ώρα πρωτογενές αντίσωμα έναντι του GR (sc-393232, Santa Cruz) σε αραιώση 1:50, διαλυμένο σε PBST 1x. Στη συνέχεια εφαρμόζεται επίσης για μία ώρα το δευτερογενές αντίσωμα red-mouse anti-goat (Lab Supplies) σε αραιώση 1:500, σε συνδυασμό με τη χρωστική για τον πυρήνα Hoechst 33342 (10 mg/ml) σε αραιώση 1:1000, διαλυμένα αμφότερα σε PBST 1x. Η επώαση τόσο για το πρωτογενές όσο και για το δευτερογενές αντίσωμα λαμβάνουν χώρα στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, οι καλυπτρίδες ακινητοποιούνται πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα με τη χρήση της κόλλας PVA και φυλάσσονται στους 4 °C έως ότου παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο φθορισμού. Το μικροσκόπιο που διαθέτει το τμήμα είναι το μοντέλο DM2000 της εταιρίας Leica και είναι εξοπλισμένο με κάμερα Qimaging optiMOS για τη λήψη φωτογραφιών (ευγενική δωρεά του Ιδρύματος Μποδοσάκης).

2.2.2 Δοκιμασία λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης

Ημέρα 0: Μέτρηση και στρώσιμο κυττάρων σε 24×well plate με πλήρες DMEM without phenol red.

HeLa → 50.000 κύτταρα/well (παράγωγα μπετουλινικού και μπουσβελλικού οξέος)

HEK293 → 55.000 κύτταρα/well (παράγωγα μπετουλινικού και μπουσβελλικού οξέος)

Ημέρα 1: Παροδική διαμόλυνση κυττάρων

i. Παροδική διαμόλυνση ευκαρυωτικών καρκινικών κυττάρων

Το μέσο διαμόλυνσης για τα πειράματα της παρούσας εργασίας ήταν η λιποφεκταμίνη 2000, που απαιτεί τη χρήση του θρεπτικού μέσου Opti-MEM. Ουσιαστικά γίνεται συνδιαμόλυνση των κυττάρων με τα πλασμίδια pMMTV-GRE-Luc και pSV40-β-Gal, η τελική συγκέντρωση του καθενός στο μείγμα της διαμόλυνσης πρέπει να είναι 0,15 μg. Άρα συνολικά χρησιμοποιούνται 0,3 μg DNA. Η αναλογία λιποφεκταμίνης/εξωγενούς DNA για τα κύτταρα HeLa είναι 1:1, ενώ για τα κύτταρα HEK293 είναι 1:0,35. Τα μg DNA που χρησιμοποιούνται στο σύνολο είναι 0,3, άρα με την απλή μέθοδο των τριών υπολογίζεται ο όγκος της λιποφεκταμίνης που ανταποκρίνεται στον λόγο λιποφεκταμίνης/εξωγενούς DNA για κάθε κυτταρική σειρά. Αφού ετοιμαστούν οι κατάλληλοι όγκοι διαμοιράζονται από 50 μl σε κάθε well κι ακολουθεί επώαση 4 ωρών για να επιτραπεί η είσοδος του DNA στα κύτταρα. Η διαδικασία τερματίζεται με αλλαγή του θρεπτικού μέσου και προσθήκη πλήρους DMEM without phenol red για 48 ώρες.

Ημέρα 3: Προσθήκη ουσιών, λύση και συλλογή κυττάρων

ii. Προσθήκη ουσιών, λύση και συλλογή κυττάρων

Οι ουσίες που εφαρμόστηκαν στα κύτταρα περιγράφονται στην ενότητα 2.1.1.2. Σε κάθε ανεξάρτητη επανάληψη των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, κάθε ουσία εφαρμόστηκε εις τριπλούν, σε τελική συγκέντρωση 10 μM, είτε παρουσία είτε απουσία DEX τελικής συγκέντρωσης 10^{-7} M, παρουσία πλήρους DMEM without phenol red. Μετά το πέρας της επώασης, γίνεται λύση με τη χρήση του διαλύματος lysis buffer 1x της Promega. Ακολουθούν 30 λεπτά επώασης στον πάγο υπό ανάδευση και αποκόλληση των κυττάρων από τα wells μέσω απόξεσης με tip. Τέλος, γίνεται φυγοκέντρωση για 30 λεπτά, στα 13.000 rpm, στους 4 °C και το υπερκείμενο φυλάσσεται στους -80 °C έως ότου χρησιμοποιηθεί.

Ημέρα 4: Μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης και ενεργότητας β-γαλακτοσιδάσης

iii. Δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη β-γαλακτοσιδάση στο πλασμίδιο pSV40-β-Gal, βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός ιδιοσυστάτα ενεργού υποκινητή. Αυτό σημαίνει ότι η έκφραση και ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης στα διαμολυσμένα με αυτή την μοριακή κατασκευή κύτταρα είναι ανεξάρτητη της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR και κατ' επέκταση ανεξάρτητη της συνθήκης που έχει εφαρμοστεί. Ακριβώς για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της λουσιφεράσης. Η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης προσδιορίζεται με μελέτη της υδρόλυσης του χρωμογόνου υποστρώματος o-Nitrophenyl-β-D-galactoside (ONPG) σύμφωνα με την αντίδραση:

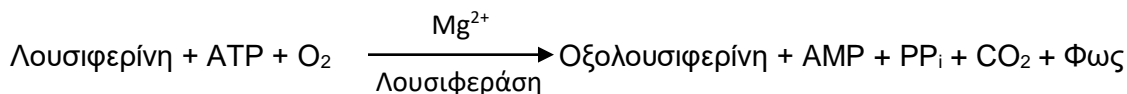


Σε 20 μl δείγματος προστίθενται 3 μl διαλύματος ιόντων Mg^{2+} 100x και 201 μl διαλύματος sodium phosphate. Το διάλυμα ιόντων Mg^{2+} αποτελείται από 31,5% v/v β-μερκαπτοαιθανόλη, 10% v/v MgCl_2 και 58,5% v/v ddH₂O. Στο τέλος προστίθενται 66 μl υποστρώματος της αντίδρασης (ONPG). Μετά την ανάπτυξη ικανοποιητικής έντασης κίτρινου χρώματος, η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 500 μl διαλύματος Na_2CO_3 1M. Η προσθήκη Na_2CO_3

έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή του pH του διαλύματος στην τιμή 11, τιμή στην οποία η β-γαλακτοσιδάση καθίσταται ανενεργή ως ένζυμο. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 420 nm, για τον προσδιορισμό της ποσότητας της ο-νιτροφαινόλης στο διάλυμα.

iv. Δοκιμασία λουσιφεράσης

Στο πλασμίδιο pMMTV-GRE-Luc, το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη λουσιφεράση, βρίσκεται καθοδικά στοιχείων GREs, άρα η έκφρασή του ελέγχεται από τον GR. Αυτό σημαίνει ότι η παρουσία και τα επίπεδα λουσιφεράσης στα διαμολυσμένα με αυτή τη μοριακή κατασκευή κύτταρα, υποδηλώνει τη μεταγραφική δραστικότητα του υποδοχέα αυτού στα αντίστοιχα κύτταρα. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ανίχνευση φωτός που παράγεται από την οξείδωση της λουσιφερίνης, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση χημειοφωταύγειας:



Η ενεργότητα της λουσιφεράσης προσδιορίζεται με μέτρηση του παραγόμενου φωτός σε λουμινόμετρο. Σε ειδικό σωλήνα αναμειγνύονται 10 μl δείγματος και 100 μl αντιδραστηρίου λουσιφεράσης και το παραγόμενο φως μετράται στο λουμινόμετρο Berthold Technologies, LuBat 39508. Η τιμή του παραγόμενου φωτός από κάθε δείγμα κανονικοποιείται με την τιμή της αντίστοιχης β-γαλακτοσιδάσης.

2.2.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Ημέρα 0: Μέτρηση και στρώσιμο κυττάρων σε 6×well plate με πλήρες DMEM without phenol red.

Hela → 100.000 κύτταρα/well (παράγωγα μπετουλινικού οξέος)

HeLa → 200.000 κύτταρα/well (παράγωγα μπουσβελλικού οξέος)

HepG2 → 300.000 κύτταρα/well (παράγωγα μπουσβελλικού οξέος)

Ημέρα 2: Προσθήκη ουσιών

i. Προσθήκη ουσιών

Για τα παράγωγα του μπετουλινικού οξέος

Μελετήθηκαν οι ουσίες PCUPO 004, PCUPO 012 και FR 381, σε τελική συγκέντρωση 10 μM, παρουσία κι απουσία DEX τελικής συγκέντρωσης 10⁻⁸ M. Η δράση των υπό μελέτη ουσιών συγκρίθηκε με τη δράση της DEX, τελικής συγκέντρωσης 10⁻⁸ M. Η επώαση με τις ουσίες διήρκεσε 48 ώρες παρουσία πλήρους DMEM without phenol red, ενώ η επώαση με DEX διήρκεσε 24 ώρες, καθώς προστέθηκε στα καλλιεργούμενα κύτταρα την 3^η ημέρα της πειραματικής διαδικασίας.

Για τα παράγωγα του μπουσβελλικού οξέος

Σε κύτταρα HeLa και HepG2, μελετήθηκαν οι ουσίες TFC 001, TFC 011, TFC 012 και TFC 013, σε τελική συγκέντρωση 10 μM, απουσία DEX, ενώ οι ουσίες TFC 002 και TFC 010 μελετήθηκαν παρουσία και απουσία DEX τελικής συγκέντρωσης 10⁻⁸ M. Η δράση των έξι ουσιών που μελετήθηκαν συγκρίθηκε με τη δράση της DEX σε τελικές συγκεντρώσεις 10⁻⁸ M και 10⁻⁹ M. Η επώαση διήρκεσε 48 ώρες παρουσία πλήρους DMEM without phenol red.

Ημέρα 4: Συλλογή κυττάρων

ii. Συλλογή και λύση των κυττάρων

Μετά το πέρας των απαιτούμενων ωρών επώασης, γίνεται συλλογή και λύση των κυττάρων. Αφού προηγηθεί έκπλυση με κρύο PBS 1x, τα κύτταρα αποκολλώνται από την επιφάνεια ανάπτυξής τους με ειδικό εργαλείο κι ακολουθεί φυγοκέντριση για 5 λεπτά στα 1000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα μπορεί είτε να αποθηκευτεί στους -80 °C, είτε να ακολουθήσει απευθείας λύση των κυττάρων με το buffer A. Αφού το ίζημα επαναδιαλυτοποιηθεί σε κατάλληλο όγκο buffer A, ακολουθεί επώαση 20 λεπτών στον πάγο και προκειμένου να επιτευχθεί αποτελεσματική λύση, ακολουθεί έκθεση των κυττάρων σε υπερήχους (1 κύκλος, 40% δύναμη) για 5 κύκλους του 1 δευτερολέπτου με μεσοδιάστημα 35 δευτερόλεπτα.

iii. Προετοιμασία δειγμάτων

Επόμενο βήμα είναι η ποσοτικοποίηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου στα κύτταρα της κάθε συνθήκης που εφαρμόστηκε, προκειμένου να προετοιμαστούν δείγματα που θα φέρουν ίσες ποσότητες πρωτεΐνης. Αυτό επιτυγχάνεται με τη μέθοδο Bradford, με φωτομέτρηση στα 595 nm. Μετά τη φωτομέτρηση, η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης σε κάθε συνθήκη του πειράματος υπολογίζεται από τον τύπο $y = 0,0345x + 0,01$, όπως αυτός προέκυψε μετά από κατασκευή πρότυπης καμπύλης με BSA. Η τελική σύσταση των δειγμάτων περιέχει sample buffer 4x, που αποτελεί το ¼ του τελικού όγκου, πρωτεϊνικό εκχύλισμα, ανάλογο του όγκου που προκύπτει από την παραπάνω εξίσωση και τέλος, μέχρι την πλήρωση του επιθυμητού όγκου προστίθεται διάλυμα Tris 20 mM pH 7.5.

iv. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή ακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) και ηλεκτρομεταφορά

Προκειμένου να μελετηθούν οι τυχόν μεταβολές στα επίπεδα συγκεκριμένων πρωτεϊνών στα διαφορετικά βιολογικά εκχυλίσματα του εκάστοτε πειράματος, πρέπει πρώτα τα πρωτεϊνικά μόρια να διαχωριστούν με βάση το μοριακό τους βάρος. Αυτό επιτυγχάνεται με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες, παρουσία του απορρυπαντικού SDS στην πηκτή. Το SDS προσδίδει ένα ομοιόμορφο αρνητικό φορτίο σε όλες τις πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα ο διαχωρισμός τους στην πηκτή να βασίζεται στο μοριακό βάρος του κάθε μορίου κι όχι στο φορτίο του. Η πηκτή αποτελείται από δύο μέρη, την πηκτή επιστοίβαξης και την πηκτή διαχωρισμού, των οποίων το pH και η αναλογία σε ακρυλαμίδα διαφέρει. Η σύσταση της πηκτής επιστοίβαξης δεν μεταβάλλεται, ενώ η περιεκτικότητα σε ακρυλαμίδα της πηκτής διαχωρισμού μεταβάλλεται ανάλογα με το μέγεθος των μορίων που πρόκειται να μελετηθούν κάθε φορά. Στην παρούσα εργασία, για τα εκχυλίσματα των παραγώγων του μπετουλινικού οξέος από κύτταρα HeLa, φορτώθηκαν 50 µg πρωτεΐνης/well σε πηκτή πάχους 1 mm. Για τα παράγωγα του μπουσβελλικού οξέος, για εκχυλίσματα από κύτταρα HeLa, φορτώθηκαν 15 µg πρωτεΐνης/well, ενώ για εκχύλισμα προερχόμενο από κύτταρα HepG2, φορτώθηκαν 20 µg πρωτεΐνης/well, σε πηκτή πάχους 1 mm. Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης (με μέγεθος πόρων 0,45 ή 0,2 µm) με την εφαρμογή τάσης, παρουσία κρύου διαλύματος ηλεκτρομεταφοράς. Η διαδικασία απαιτεί η πηκτή και η μεμβράνη να βρίσκονται σε άμεση επαφή, χωρίς την ύπαρξη ενδιάμεσων φυσαλίδων, διότι η παρουσία τους δυσχεραίνει την ομαλή έκβαση της ηλεκτρομεταφοράς.

v. Blocking με γάλα κι επώαση με πρωτογενές αντίσωμα

Στη συνέχεια, η μεμβράνη επωάζεται για 1 ώρα σε διάλυμα 10% αποβουτυρωμένου γάλακτος-PBST 1x. Το βήμα αυτό πραγματοποιείται προκειμένου οι μη ειδικές θέσεις στη μεμβράνη να καλυφθούν από τις πρωτεΐνες του γάλακτος, για να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες εμφάνισης ψευδός θετικού σήματος, λόγω μη ειδικής σύνδεσης του αντισώματος που θα εφαρμοστεί. Ακολουθεί η προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος για επώαση 16 ωρών (overnight), στους 4 °C υπό ανάδευση.

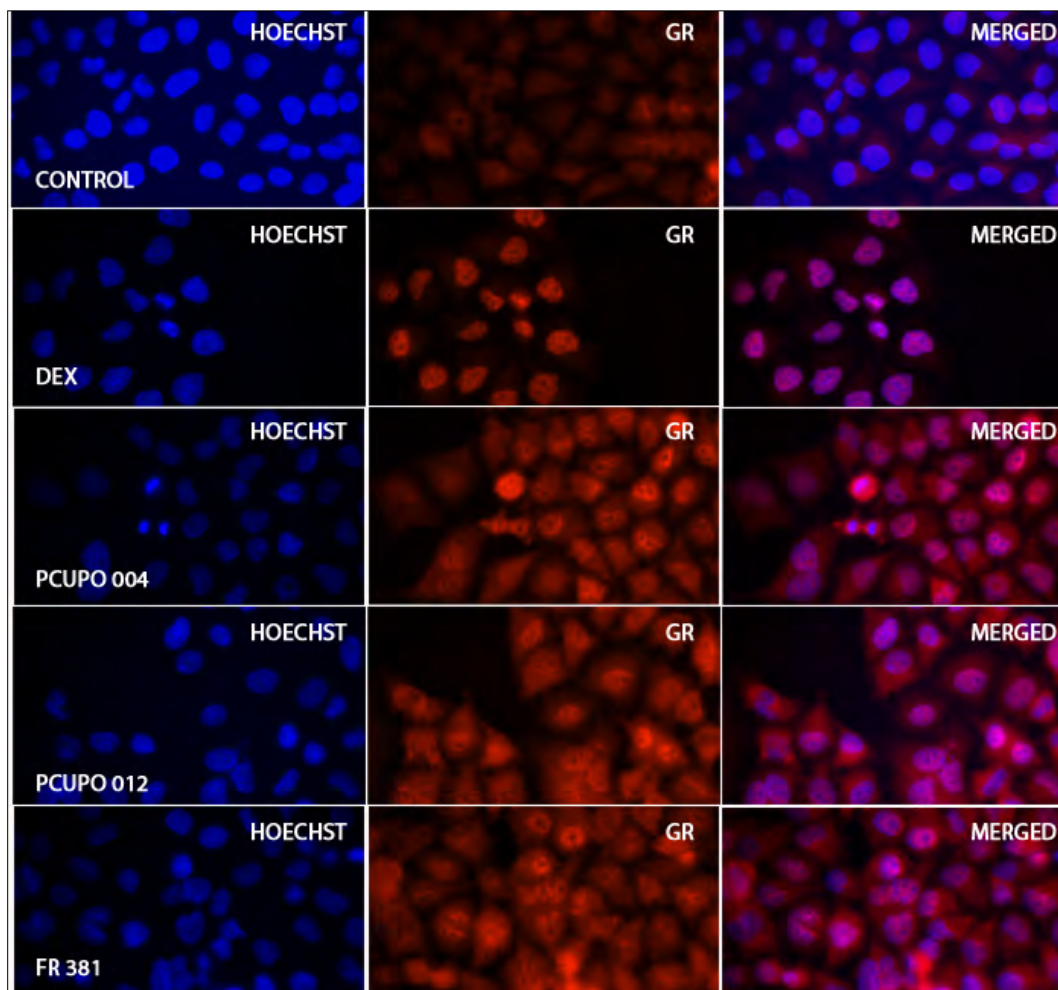
vi. Προσθήκη δευτερογενούς αντισώματος και ανοσοαποτύπωση κατά Western

Μετά την overnight επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα, ακολουθούν εκπλύσεις με διάλυμα PBST 1x ή TBST 1x, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρωτογενούς αντισώματος κι εφαρμόζεται για μια ώρα το δευτερογενές αντίσωμα, σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι σημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου (Horseradish Peroxidase, HRP), το οποίο έπεται από την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος (διαλύματα ECLA και ECLB σε αναλογία 1:1), καταλύει μια χημική αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή χημειοφωταύγειας. Έπειτα, φέροντας τη μεμβράνη σε επαφή με φιλμ στο σκοτάδι, το φως από την αντίδραση που έχει προηγηθεί, που είναι ανάλογο της ποσότητας του αντισώματος που προσδέθηκε κι άρα της πρωτεΐνης που υπάρχει στη μεμβράνη, δίνει εικόνα για τα σχετικά επίπεδα. Τέλος, για την εμφάνιση του σήματος που έχει αποτυπωθεί στο φιλμ, χρησιμοποιούνται τα διαλύματα Developer (ανάπτυξης σήματος) και Fixer (μονιμοποίησης σήματος).

3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.1 Επίδραση των παραγώγων του μπετουλινικού οξέος στη μεταγραφική δραστικότητα του GR και πιο ειδικά στο μηχανισμό trans-ενεργοποίησης

Η DEX, ως συνθετικό γλυκοκορτικοειδές, αλληλεπιδρά με τον GR και προωθεί τη μετατόπισή του από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Αποτελέσματα παλαιότερων μελετών σε κύτταρα HeLa, με τη εφαρμογή της μεθόδου της ανοσοκυτταροχημείας, υποδεικνύουν την ικανότητα των ουσιών PCUPO 004 και PCUPO 012, τελικής συγκέντρωσης 10 μ M, να επάγουν μερικώς την πυρηνική μετατόπιση του GR. Παρόμοιες ήταν και οι παρατηρήσεις σε επανάληψη της ανοσοκυτταροχημικής μελέτης για τις ουσίες αυτές, καθώς και για την ουσία FR 381, τελικής συγκέντρωσης επίσης στα 10 μ M. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 8.

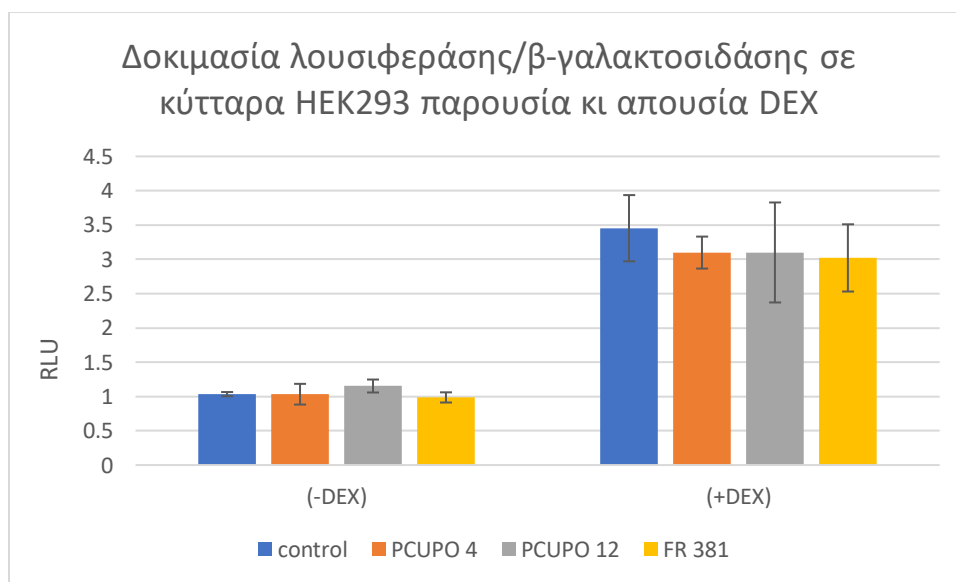


Εικόνα 8. Επίδραση των παραγώγων του μπετουλινικού οξέος στην πυρηνική μετακίνηση του GR. Ανοσοκυτταροχημική μελέτη του GR σε κύτταρα HeLa, παρουσία 10^{-6} M DEX και παρουσία 10 μ M των ουσιών PCUPO 004, PCUPO 012 και FR 381.

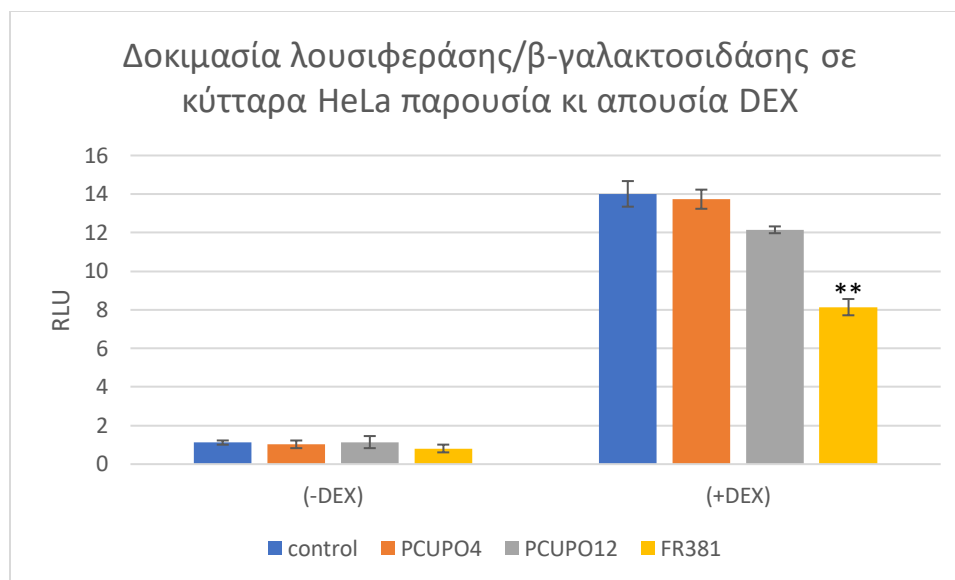
Πιο αναλυτικά, όπως φαίνεται και στην εικόνα 8, παρουσία DEX, ο GR μεταφέρεται εξ' ολοκλήρου στον πυρήνα, όπως είναι αναμενόμενο. Παρουσία των ουσιών, ο εντοπισμός του GR στο κυτταρόπλασμα μειώνεται, ενώ ενισχύεται η πυρηνική εντόπιση του GR, συγκριτικά

με τον αντίστοιχο εντοπισμό του GR στη συνθήκη αναφοράς (control). Η παρατήρηση αυτή αποδεικνύει ότι η δομή των συγκεκριμένων ουσιών τους προσδίδει την ικανότητα να προσδένονται και να αλληλεπιδρούν με τον GR, πυροδοτώντας την πυρηνική μετατόπιση κι ενεργοποίησή του. Στη συνέχεια, επιθυμητό ήταν να ελεγχθεί κατά πόσο η πυρηνική μετατόπιση του GR, που προωθείται από τις παραπάνω ουσίες, συνοδεύεται κι από μεταγραφική ενεργοποίηση του GR και μάλιστα τον μηχανισμό της trans-ενεργοποίησης που, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενες ενότητες, συνδέεται σε σημαντικό βαθμό με τις παρενέργειες που εμφανίζει η χρόνια χρήση των γλυκοκορτικοειδών.

Αποτελέσματα δοκιμασίας λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές HEK293 και HeLa, που παρουσιάζονται στις εικόνες 9 και 10 αντίστοιχα, δείχνουν ότι η επαγωγή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τη DEX είναι 3,3 φορές και 12,5 φορές πάνω από τη συνθήκη αναφοράς (control), όπως και είναι αναμενόμενο. Αντίθετα, παρουσία των ουσιών και στις δύο καρκινικές σειρές, η μεταγραφική δραστηριότητα του GR δεν μεταβάλλεται. Μάλιστα, η επώαση των κυττάρων HeLa με τις υπό μελέτη ουσίες σε συνδυασμό με τη DEX οδήγησε σε σχετική μείωση της από DEX επαγόμενης ενεργοποίησης της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, με την ουσία FR 381 να προκαλεί 1,7 φορές μείωση.

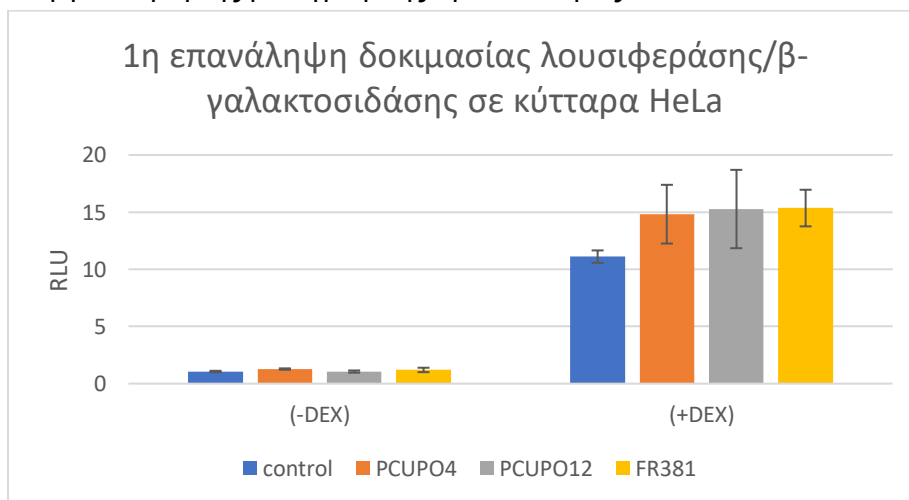


Εικόνα 9. Σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης σε κύτταρα HEK293 υπό τη δράση των ουσιών PCUPO 004, PCUPO 012 και FR 381, παρουσία κι απουσία DEX. Κύτταρα HEK293 καλλιεργήθηκαν παρουσία θρεπτικού μέσου DMEM without phenol red, διαμολύνθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς pMMTV-GRE-Luc και pSV40-β-Gal με τη χρήση λιτοφεκταμίνης ως μέσου διαμόλυνσης κι ακολούθως επώαστηκαν για 6 ώρες με τις ουσίες PCUPO 004, PCUPO 012 και FR 381 σε συγκέντρωση 10 μΜ, παρουσία κι απουσία DEX συγκέντρωσης 10⁻⁷ Μ. Ακολούθησε μέτρηση της σχετικής δραστηριότητας λουσιφεράσης (Relative Luciferase Units, RLU).

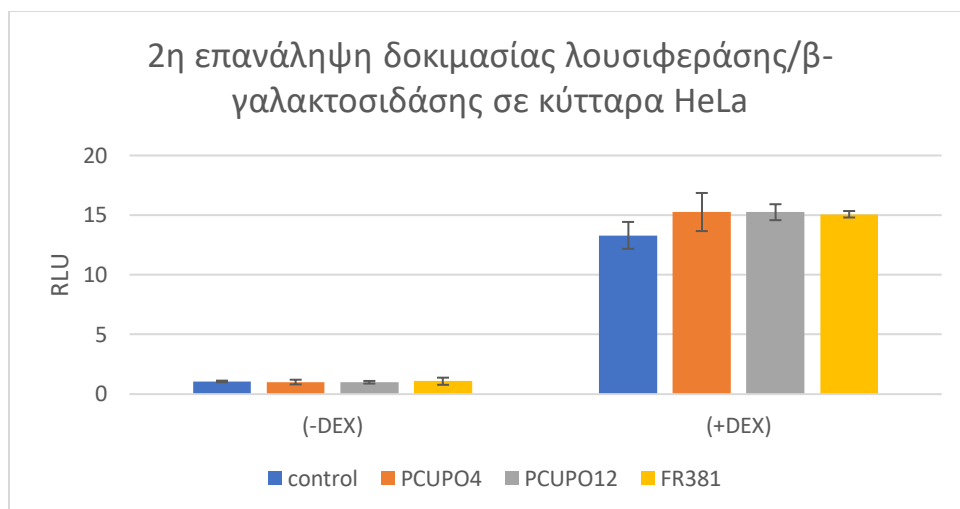


Εικόνα 10. Σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης σε κύτταρα HeLa υπό τη δράση των ουσιών PCUPO 004, PCUPO 012 και FR 381, παρουσία κι απουσία DEX. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν παρουσία θρεπτικού μέσου DMEM without phenol red, διαμολύνθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς pMMTV-GRE-Luc και pSV40-β-Gal με τη χρήση λιποφεκταμίνης ως μέσου διαμόλυνσης κι ακολούθως επωάστηκαν για 6 ώρες με τις ουσίες PCUPO 004, PCUPO 012 και FR 381 σε συγκέντρωση 10 μM, παρουσία κι απουσία DEX συγκέντρωσης 10^{-7} M. Ακολούθησε μέτρηση της σχετικής δραστηριότητας λουσιφεράσης (Relative Luciferase Units, RLU).

Δυστυχώς όμως, η παρατήρηση αυτή δεν παρουσιάζει επαναληψιμότητα, όπως φαίνεται και στις **εικόνες 11 και 12**, πιθανόν λόγω της μείωσης της δραστηριότητας των ουσιών με την πάροδο του χρόνου. Σε κάθε περίπτωση, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι οι ουσίες δεν εμφανίζουν ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR.

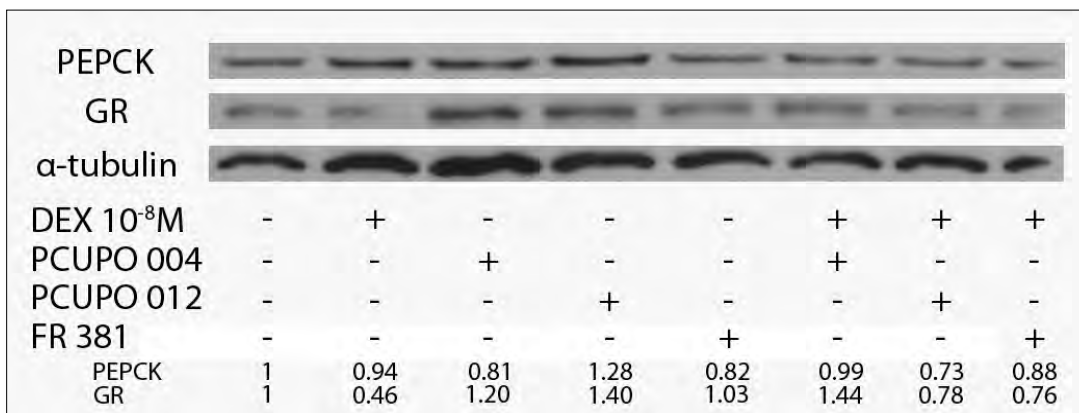


Εικόνα 11. Σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης σε κύτταρα HeLa υπό τη δράση των ουσιών PCUPO 004, PCUPO 012 και FR 381, παρουσία κι απουσία DEX. Το παρόν αποτελεί ανεξάρτητη βιολογική επανάληψη από αυτή της εικόνας 10. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν παρουσία θρεπτικού μέσου DMEM without phenol red, διαμολύνθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς pMMTV-GRE-Luc και pSV40-β-Gal με τη χρήση λιποφεκταμίνης ως μέσου διαμόλυνσης κι ακολούθως επωάστηκαν για 6 ώρες με τις ουσίες PCUPO 004, PCUPO 012 και FR 381 σε συγκέντρωση 10 μM, παρουσία κι απουσία DEX συγκέντρωσης 10^{-7} M. Ακολούθησε μέτρηση της σχετικής δραστηριότητας λουσιφεράσης (Relative Luciferase Units, RLU).



Εικόνα 12. Σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης σε κύτταρα HeLa υπό τη δράση των ουσιών PCUPO 004, PCUPO 012 και FR 381, παρουσία κι απουσία DEX. Το παρόν αποτελεί ανεξάρτητη βιολογική επανάληψη από αυτές των εικόνων 10 και 11. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν παρουσία θρεπτικού μέσου DMEM without phenol red, διαμολύνθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς pMMTV-GRE-Luc και pSV40-β-Gal με τη χρήση λιτοφεκταμίνης ως μέσου διαμόλυνσης κι ακολούθως επωάστηκαν για 6 ώρες με τις ουσίες PCUPO 004, PCUPO 012 και FR 381 σε συγκέντρωση 10 μ M, παρουσία κι απουσία DEX συγκέντρωσης 10⁻⁷ M. Ακολούθησε μέτρηση της σχετικής δραστηριότητας λουσιφεράσης (Relative Luciferase Units, RLU).

Με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση της πιθανής ανταγωνιστικής δράσης των ουσιών στην από DEX επαγόμενη ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, μελετήθηκε η επίδραση των ουσιών PCUPO 004, PCUPO 012 και FR 381 στα επίπεδα έκφρασης της PEPCK, καθώς και του GR, σε κύτταρα HeLa μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά western. Η PEPCK παίζει καθοριστικό ρόλο στο μονοπάτι της γλυκονεογένεσης και το γονίδιο που κωδικοποιεί για το μόριο αυτό αποτελεί γονίδιο-στόχο του GR στο μηχανισμό της trans-ενεργοποίησης. Τα αποτελέσματα, που παρουσιάζονται στην **εικόνα 13**, έδειξαν ότι οι συγκεκριμένες ουσίες δεν προκαλούν αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK, ούτε και επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR. Ωστόσο, η μη παρατηρούμενη επαγωγή της PEPCK από DEX οφείλεται στην από DEX επαγόμενη μείωση των επιπέδων του GR.

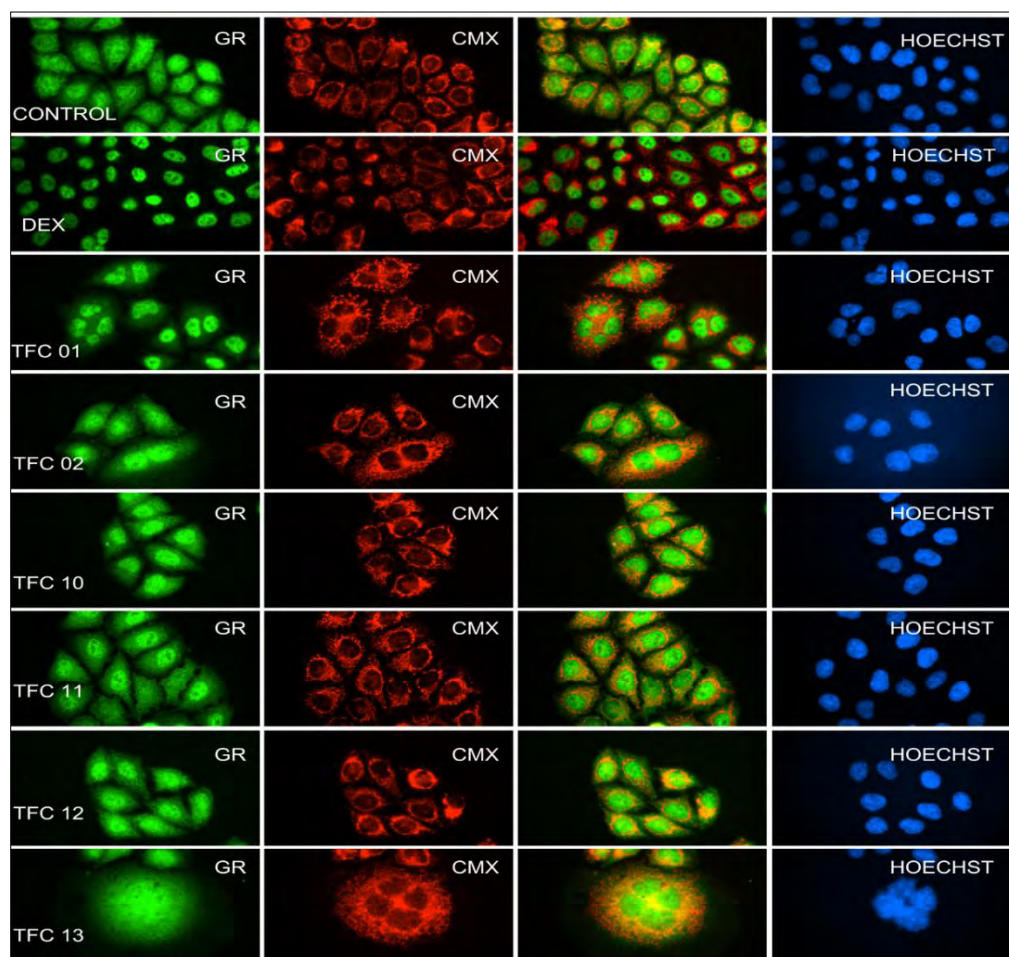


Εικόνα 13. Επίδραση των παραγώγων μπετουλινικού οξέος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK και του GR σε εκχύλισμα κυττάρων HeLa. Κύτταρα HeLa κατεργάστηκαν με τις ουσίες, όπως υποδεικνύεται στην εικόνα, σε συγκέντρωση 10 μ M,

παρουσία κι απουσία DEX 10^{-8} M, και τα επίπεδα PEPCK, GR και α -τουμπουλίνης (μόριο κανονικοποίησης) εκτιμήθηκαν με εφαρμογή της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά western και χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων. Οι αριθμοί υποδηλώνουν τις επιφερόμενες μεταβολές στα επίπεδα PEPCK και GR, κανονικοποιημένες ως προς α -τουμπουλίνη και συγκρινόμενες ως προς την συνθήκη αναφοράς (control).

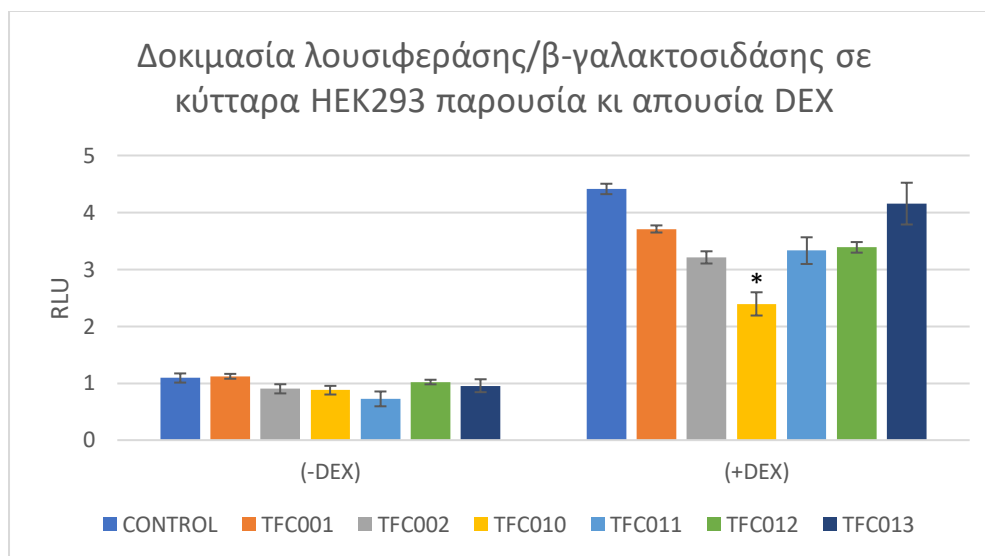
3.2 Επίδραση των παραγώγων του μπουσβελλικού οξέος στη μεταγραφική δραστηριότητα του GR και πιο ειδικά στο μηχανισμό trans-ενεργοποίησης

Προηγούμενες παρατηρήσεις του εργαστηρίου μας δείχνουν ότι όμοια δράση με τα παράγωγα του μπετουλινικού οξέος όσο αφορά την ενεργοποίηση της πυρηνικής μετατόπισης του GR (ενότητα 3.1), παρουσιάζουν και τα παράγωγα του μπουσβελλικού οξέος (εικόνα 14, διπλωματική διατριβή μεταπτυχιακής φοιτήτριας Κυλινδρή Παρασκευής).



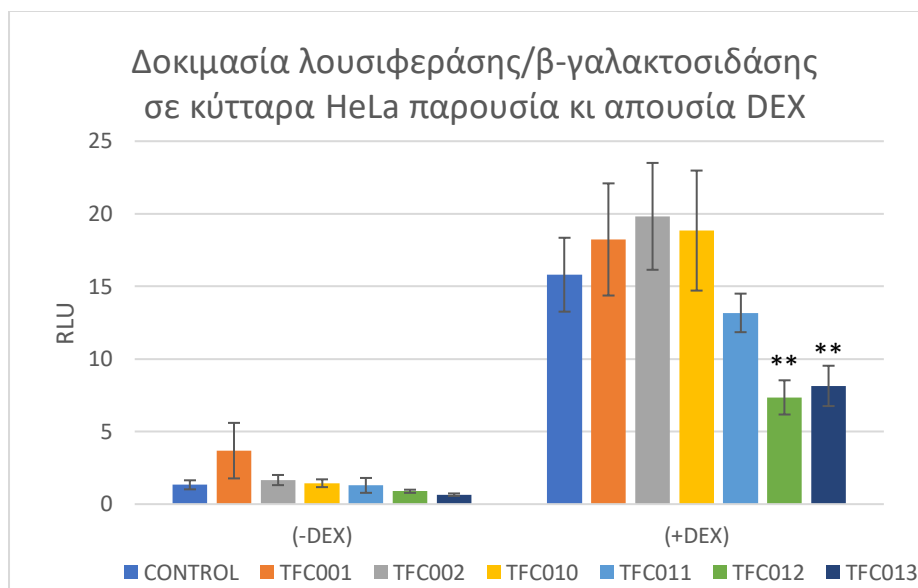
Εικόνα 14. Επίδραση παραγώγων μπουσβελλικού οξέος στην πυρηνική μετακίνηση του GR. Ανοσοκυτταροχημική μελέτη του GR σε κύτταρα HeLa, παρουσία 10^{-6} M DEX και παρουσία 10 μ M των ουσιών TFC 001, TFC 002, TFC 010, TFC 011, TFC 012 και TFC 013. Το παρόν πείραμα αποτελεί μέρος της μεταπτυχιακής διατριβής της φοιτήτριας Κυλινδρή Παρασκευής.

Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα δοκιμασίας λουσιφεράσης/ β -γαλακτοσιδάσης, για να εκτιμηθεί εάν τα παράγωγα του μπουσβελλικού οξέος φέρουν δυναμικό ενεργοποίησης της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR. Τα πειράματα εφαρμόστηκαν σε καρκινικές κυτταρικές σειρές HEK293 και HeLa.



Εικόνα 15. Σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης σε κύτταρα HEK293 υπό τη δράση των ουσιών TFC 001, TFC 002, TFC 010, TFC 011, TFC 012 και TFC 013, παρουσία κι απουσία DEX. Κύτταρα HEK293 καλλιεργήθηκαν παρουσία θρεπτικού μέσου DMEM without phenol red, διαμολύνθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς pMMTV-GRE-Luc και pSV40-β-Gal με τη χρήση λιποφεκταμίνης ως μέσου διαμόλυνσης κι ακολούθως επώαστηκαν για 6 ώρες με τις ουσίες TFC 001, TFC 002, TFC 010, TFC 011, TFC 012 και TFC 013 σε συγκέντρωση 10 μM, παρουσία κι απουσία DEX συγκέντρωσης 10^{-7} M. Ακολούθησε μέτρηση της σχετικής δραστηριότητας λουσιφεράσης (Relative Luciferase Units, RLU). ($P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, $n=3$).*

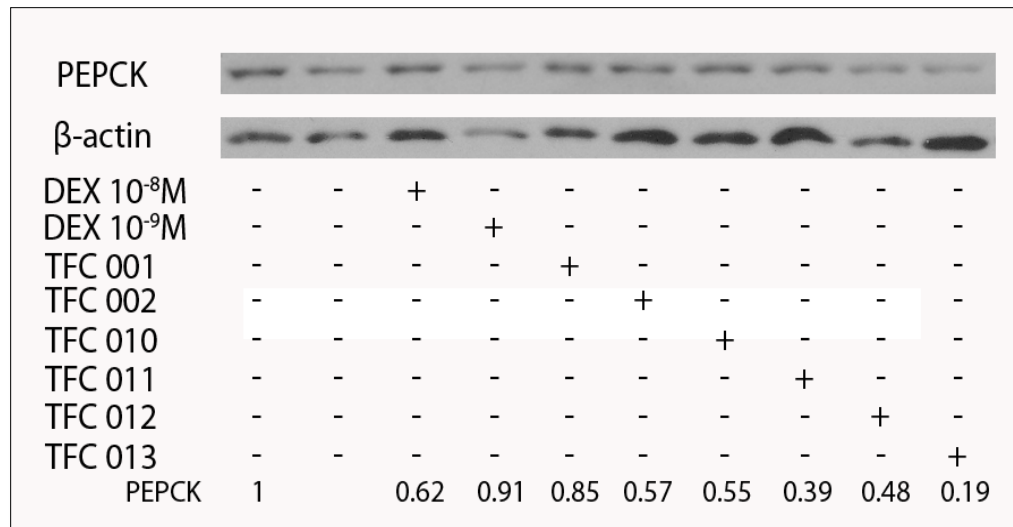
Όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 15, η επαγωγή της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τη DEX, είναι 4 φορές πάνω από τη συνθήκη αναφοράς (control), γεγονός αναμενόμενο. Παρουσία των ουσιών, η μεταγραφική δραστηριότητα του GR δεν μεταβάλλεται, ενώ η συγχορήγηση της πλειοψηφίας των ουσιών (TFC001, TFC002, TFC0010, TFC0011, TFC0012) με DEX προκαλεί μείωση της από DEX επαγόμενης ενεργοποίησης της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, με την ουσία TFC 010 να παρουσιάζει 1,9 φορές μείωση συγκριτικά με τη DEX. Η παρατήρηση αυτή δείχνει ότι πιθανώς οι συγκεκριμένες ουσίες ανταγωνίζονται τη δράση της DEX στα κύτταρα HEK293. Όμοια δράση όσο αφορά τις ουσίες TFC0011, TFC0012, παρατηρήθηκε και σε κύτταρα HeLa, όπου εντοπίστηκε ανταγωνιστική δράση και της ουσίας TFC0013, έναντι αυτής της DEX. Όπως φαίνεται στην εικόνα 16, και εδώ η DEX επάγει κατά 11,8 φορές τη μεταγραφική δραστηριότητα του GR, σε σχέση με τις συνθήκες αναφοράς (control). Παρουσία των ουσιών TFC 001, TFC 002 και TFC 010 σε συνδυασμό με τη DEX παρατηρήθηκε μια τάση αύξησης της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική όταν αυτή συγκριθεί με την επαγωγή της DEX.



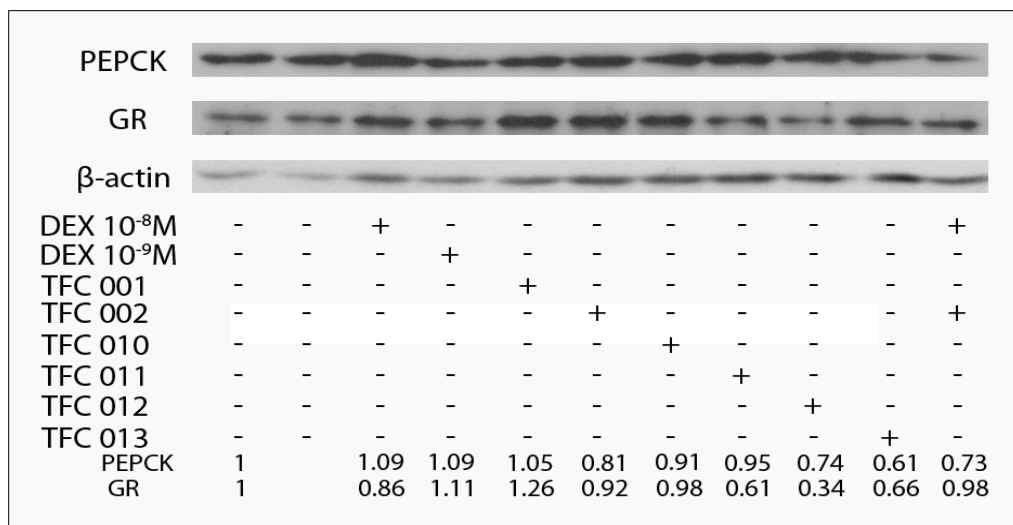
Εικόνα 16. Σχετική δραστηριότητα λουσιφεράσης σε κύτταρα HeLa υπό τη δράση των ουσιών TFC 001, TFC 002, TFC 010, TFC 011, TFC 012 και TFC 013, παρουσία κι απουσία DEX. Κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν παρουσία θρεπτικού μέσου DMEM without phenol red, διαμολύνθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς pMMTV-GRE-Luc και pSV40-β-Gal με τη χρήση λιποφεκταμίνης ως μέσου διαμόλυνσης κι ακολούθως επωάστηκαν για 6 ώρες με τις ουσίες TFC 001, TFC 002, TFC 010, TFC 011, TFC 012 και TFC 013 σε συγκέντρωση 10 μ M, παρουσία κι απουσία DEX συγκέντρωσης 10^{-7} M. Ακολούθησε μέτρηση της σχετικής δραστηριότητας λουσιφεράσης (Relative Luciferase Units, RLU).

Τα αποτελέσματά μας όσο αφορά τη δράση των ουσιών TFC 012 και TFC 013 σε συνδυασμό με την DEX συνάδουν και με παρατηρήσεις από παλαιότερα πειράματα της υποψήφιας διδάκτορος Καρρά Αικατερίνης, στην ίδια κυτταρική σειρά, υπό τις ίδιες συνθήκες. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι οι ουσίες TFC 012 και TFC 013 σε συνδυασμό με την DEX προκαλούν μείωση της από DEX επαγόμενης ενεργοποίησης της μεταγραφικής δραστηριότητας GR κατά 2,1 και 1,9 φορές αντίστοιχα. Οι όποιες διαφορές παρατηρούνται στη δράση των ουσιών ανάμεσα στις δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, πιθανόν να αποδίδονται στην παρουσία διαφορετικών συμπαραγόντων στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο της μεταγραφής, το οποίο δημιουργείται έπειτα από την πυρηνική μετατόπιση του GR. Σε συνδυασμό με τα παραπάνω έγινε εκτίμηση των επιπέδων της PEPCCK, καθώς και των επιπέδων του GR, με ανοσοαποτύπωση κατά western, τόσο σε κύτταρα HeLa όσο και σε κύτταρα HepG2.

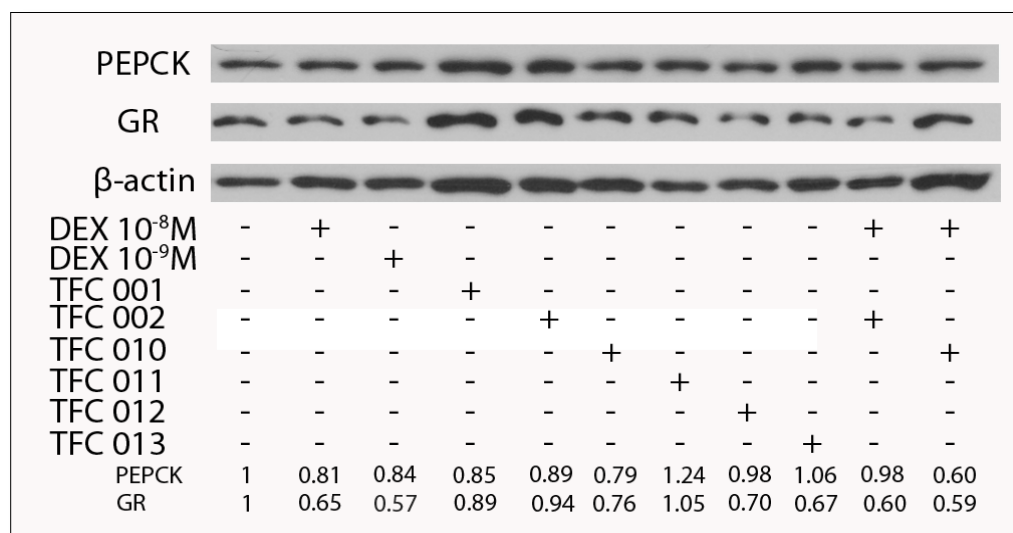
A)



B)



Γ)



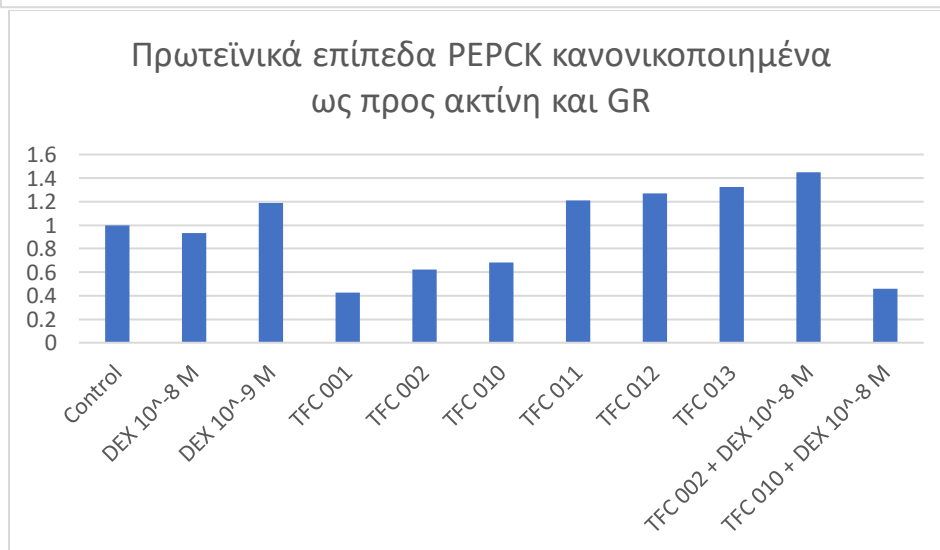
Εικόνα 17. Επίδραση των παραγώγων μποςβελλικού οξέος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK και του GR σε εκχύλισμα κυττάρων HeLa. Κύτταρα HeLa κατεργάστηκαν με τις ουσίες TFC 001, TFC 002, TFC 010, TFC 011, TFC 012 και TFC 013, σε συγκέντρωση 10 μ M, παρουσία κι απουσία DEX 10⁻⁸ M, όπως υποδεικνύεται στις εικόνες Α,Β,Γ και τα επίπεδα PEPCK, GR και της β -ακτίνης (μόριο κανονικοποίησης) εκτιμήθηκαν με εφαρμογή της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά western και χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων. Οι αριθμοί υποδηλώνουν τις επιφερόμενες μεταβολές στα επίπεδα PEPCK και GR, κανονικοποιημένες ως προς β -ακτίνη και συγκρινόμενες ως προς την συνθήκη αναφοράς (control). Οι τρεις εικόνες αποτελούν αποτέλεσμα ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων.

Στην εικόνα 17, φαίνονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά western των μορίων PEPCK, GR και β -ακτίνης σε εκχυλίσματα κυττάρων HeLa, τα οποία είχαν κατεργαστεί με τις ουσίες TFC 001, TFC 011, TFC 012 και TFC 013, σε τελική συγκέντρωση 10 μ M, απουσία DEX, ενώ οι ουσίες TFC 002 και TFC 010 μελετήθηκαν παρουσία και απουσία DEX τελικής συγκέντρωσης 10⁻⁸ M. Η δράση των έξι ουσιών που μελετήθηκαν συγκρίθηκε με τη δράση της DEX σε τελικές συγκεντρώσεις 10⁻⁸ M και 10⁻⁹ M. Δεδομένου ότι η έκφραση της PEPCK ελέγχεται από τον GR, ελέγχθηκε η επίδραση των ουσιών τόσο στα επίπεδα PEPCK όσο και στα επίπεδα GR.

A)



B)

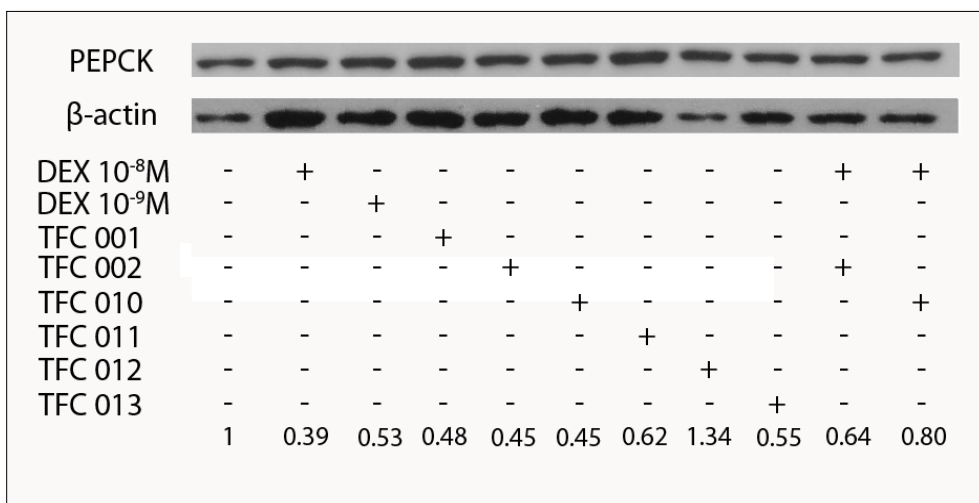


Γράφημα 1. Παρουσίαση των πρωτεϊνικών επιπέδων της PEPCK σε κυτταρικό εκχύλισμα HeLa έπειτα από κανονικοποίηση ως προς τα επίπεδα της β -ακτίνης και του GR. Τα γραφήματα Α και Β αντιστοιχούν στις ενότητες Β και Γ της εικόνας 17 αντίστοιχα.

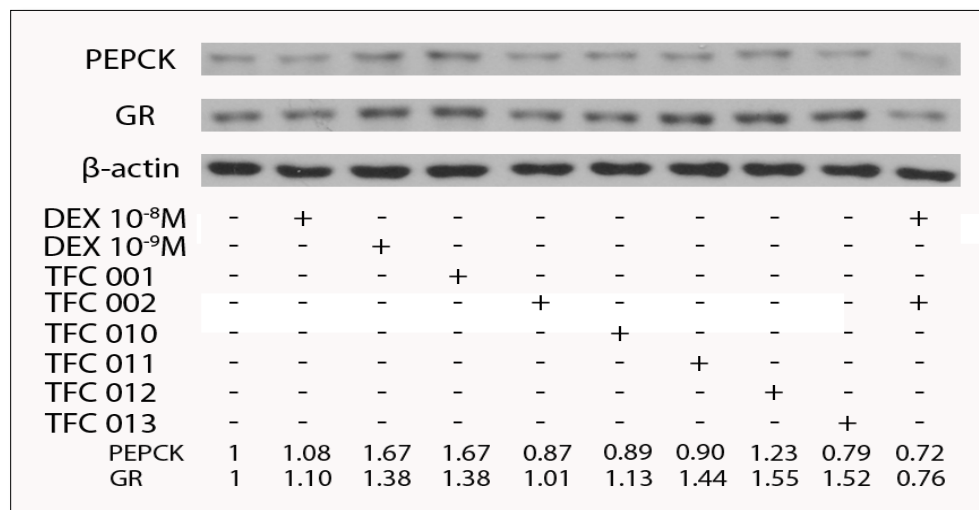
Όπως παρατηρείται, όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της DEX που εφαρμόζεται, τόσο τείνουν να μειώνονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα του GR. Ομοίως η ουσία TFC 012 επιφέρει 2,9 φορές μείωση σε σχέση με τη συνθήκη αναφοράς (control). Εάν ληφθούν υπόψιν τα επίπεδα της PEPCK σε σύγκριση και με τα επίπεδα του GR (γράφημα 1), παρατηρείται ότι παρουσία των ουσιών τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK είτε μειώνονται είτε δεν αυξάνονται στατιστικά σημαντικά. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι ακόμα κι αν οι ουσίες επιδρούν στα επίπεδα του GR, εφόσον η σύνθεση της PEPCK δεν επάγεται, δεν επέρχεται ενεργοποίηση των γλυκονεογεννετικών δράσεων του GR. Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού συμφωνούν και επιβεβαιώνουν αποτελέσματα παλαιότερων επαναλήψεων του εργαστηρίου.

Στην εικόνα 18 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ανοσοαποτύπωσης κατά western σε κύτταρα HepG2.

A)



B)



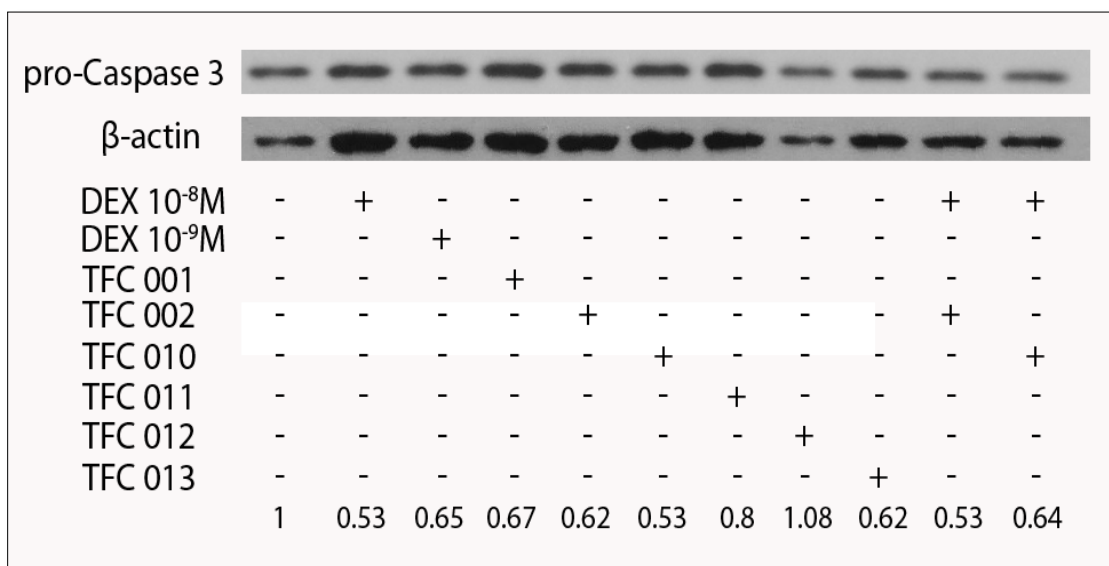
Εικόνα 18. Επίδραση των παραγώγων μισοθελικού οξέος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK και του GR σε εκχύλισμα κυττάρων HeLa. Κύτταρα HeLa κατεργάστηκαν με τις ουσίες TFC 001, TFC 002, TFC 010, TFC 011, TFC 012 και TFC 013, σε συγκέντρωση $10 \mu M$, παρουσία κι απουσία DEX $10^{-8} M$, όπως υποδεικνύεται στις εικόνες A και B, και τα επίπεδα PEPCK, GR και της β -ακτίνης (μόριο κανονικοποίησης) εκτιμήθηκαν με εφαρμογή της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά western και χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων. Οι αριθμοί υποδηλώνουν τις επιφερόμενες μεταβολές στα επίπεδα PEPCK και

GR, κανονικοποιημένες ως προς β-ακτίνη και συγκρινόμενες ως προς την συνθήκη αναφοράς (control). Οι δύο εικόνες αποτελούν αποτελέσματα ανεξάρτητων βιολογικών επαναλήψεων.

Όπως παρατηρείται, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK παρουσία των ουσιών, λαμβάνοντας υπόψιν και τις επαγόμενες μεταβολές στα επίπεδα GR δεν παρουσιάζουν σημαντική αύξηση/μεταβολή συγκριτικά με αντίστοιχα επίπεδα στη συνθήκη αναφοράς (control).

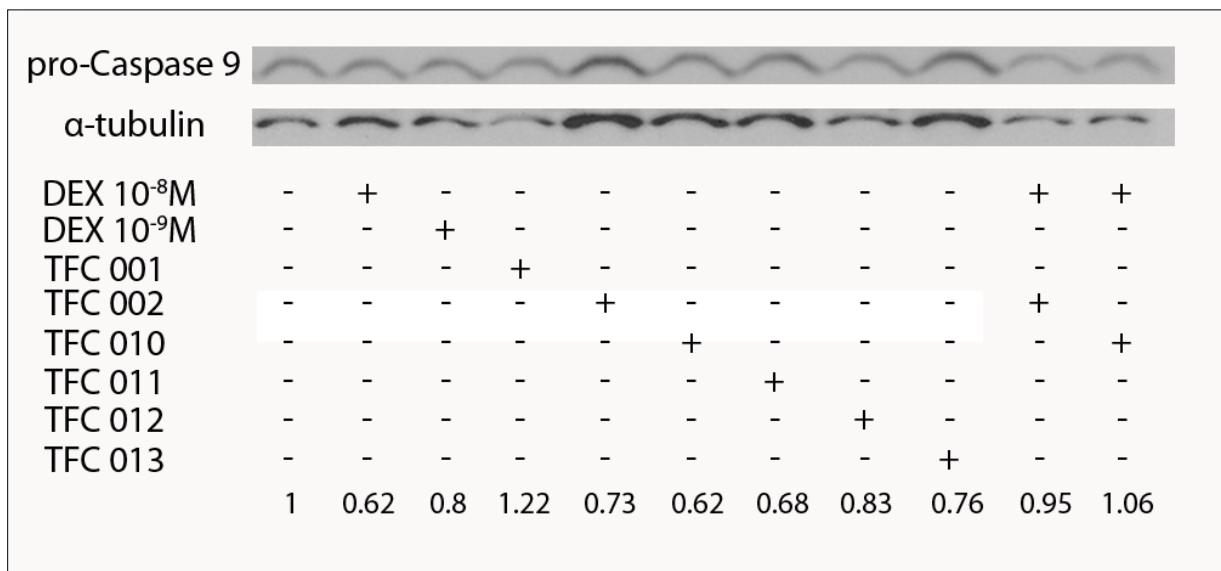
3.3 Επίδραση των παραγώγων του μπουσβελλικού οξέος στην εξαρτώμενη από τον GR απόπτωση

Ακολούθησε έλεγχος της επίδρασης των παραγώγων του μπουσβελλικού οξέος στην εξαρτώμενη από τον GR απόπτωση, σε κύτταρα HeLa και HepG2, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά western. Στην [εικόνα 19](#) παρουσιάζονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 3 και της β-ακτίνης σε εκχύλισμα κυττάρων HepG2, ενώ σημειώνονται και οι τιμές των επιπέδων της προ-κασπάσης 3 έπειτα από κανονικοποίηση με τα επίπεδα της β-ακτίνης. Όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, η DEX προωθεί την εξαρτώμενη από τον GR απόπτωση, γι' αυτό και τα επίπεδα της προ-κασπάσης 3 τόσο παρουσία DEX 10^{-8} M όσο και παρουσία DEX 10^{-9} M, φαίνονται μειωμένα συγκριτικά με τη συνθήκη αναφοράς (control). Όπως παρατηρείται στην [εικόνα 19](#), τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 3 παρουσία των ουσιών, παρουσιάζουν μία τάση για μείωση, συγκριτικά όμοια με τη μείωση που επιφέρει η παρουσία της DEX στα επίπεδα του μορίου αυτού (περίπου 40%). Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, υποδεικνύεται πιθανή αποπτωτική δράση των συγκεκριμένων ουσιών σε καρκινικά κύτταρα ήπατος.



Εικόνα 19. Επίδραση των παραγώγων μπουσβελλικού οξέος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 3 σε εκχύλισμα κυττάρων HepG2. Κύτταρα HepG2 κατεργάστηκαν με τις ουσίες TFC 001, TFC 002, TFC 010, TFC 011, TFC 012 και TFC 013, σε συγκέντρωση 10 μ M, παρουσία κι απουσία DEX 10^{-8} M, όπως υποδεικνύεται στην εικόνα και τα επίπεδα προ-κασπάσης 3 και της β-ακτίνης (μόριο κανονικοποίησης) εκτιμήθηκαν με εφαρμογή της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά western και χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων. Οι αριθμοί υποδηλώνουν τις επιφερόμενες μεταβολές στα επίπεδα προ-κασπάσης 3 κανονικοποιημένες ως προς β-ακτίνη και συγκρινόμενες ως προς την συνθήκη αναφοράς (control).

Στην εικόνα 20 παρουσιάζονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 9 και της β-ακτίνης σε εκχύλισμα κυττάρων HeLa, ενώ σημειώνονται και οι τιμές των επιπέδων της προ-κασπάσης 9 έπειτα από κανονικοποίηση με τα επίπεδα της β-ακτίνης.



Εικόνα 20. Επίδραση των παραγώγων μπισβελλικού οξέος στα πρωτεϊνικά επίπεδα της προ-κασπάσης 9 σε εκχύλισμα κυττάρων HeLa. Κύτταρα HeLa κατεργάστηκαν με τις ουσίες TFC 001, TFC 002, TFC 010, TFC 011, TFC 012 και TFC 013, σε συγκέντρωση 10 μ M, παρουσία κι απουσία DEX 10^{-8} M, όπως υποδεικνύεται στην εικόνα και τα επίπεδα προ-κασπάσης 9 και της β-ακτίνης (μόριο κανονικοποίησης) εκτιμήθηκαν με εφαρμογή της μεθόδου ανοσοαποτύπωσης κατά western και χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων. Οι αριθμοί υποδηλώνουν τις επιφερόμενες μεταβολές στα επίπεδα προ-κασπάσης 9 κανονικοποιημένες ως προς β-ακτίνη και συγκρινόμενες ως προς την συνθήκη αναφοράς (control).

Όπως μπορεί να παρατηρηθεί, τα επίπεδα της προ-κασπάσης 9 παρουσία DEX 10^{-8} M μειώνονται κατά περίπου 40%, ενώ τόσο παρουσία DEX 10^{-9} M όσο και παρουσία των ουσιών η μείωση αυτή κυμαίνεται μεταξύ 0-25%.

4. Συμπεράσματα

4.1 Παράγωγα του μπετουλινικού οξέος

Όπως παρουσιάζεται και στην ενότητα 3.1, οι ουσίες PCUPO 004, PCUPO 012 και FR 381, παράγωγα του μπετουλινικού οξέος, προωθούν σε ένα σημαντικό ποσοστό τη μετατόπιση του GR από το κυτταρόπλασμα, όπου βρίσκεται σε ανενεργή μορφή, στον πυρήνα, συγκριτικά με τη συνθήκη αναφοράς (control), παρατήρηση που υποδεικνύει ότι οι συγκεκριμένες ουσίες προσδένονται και αλληλεπιδρούν με τον GR. Η προωθούμενη από τις παραπάνω ουσίες πυρηνική μετατόπιση του GR, δεν συνοδεύεται κι από μεταγραφική ενεργοποίηση, όπως φανερώνουν τα αποτελέσματα λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης, με τη χρήση του γονιδίου της λουσιφεράσης υπό τον έλεγχο GREs, τόσο σε κύτταρα HeLa όσο και σε κύτταρα HEK293. Το παραπάνω αποτέλεσμα επιβεβαιώνεται κι από τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά western για τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCCK, όπου δεν παρατηρήθηκε αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα του συγκεκριμένου μορίου, έπειτα από κατεργασία κυτάρων HeLa με τις προς μελέτη ουσίες. Θυμίζουμε ότι το γονίδιο της PEPCCK αποτελεί άμεσο μεταγραφικό στόχο του GR στο μηχανισμό της trans-ενεργοποίησης και παίζει καθοριστικό ρόλο στην πορεία της γλυκονεογένεσης (βιβλιογραφία). Αξίζει να σημειωθεί ότι η δραστικότητα των συγκεκριμένων ουσιών, όσο αφορά την ικανότητά τους για ενεργοποίηση της μεταγραφικής δραστικότητας του GR, επηρεάζεται από το χρόνο φύλαξής τους, δεδομένου ότι η πάροδος του χρόνου επηρεάζει την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

Επιπλέον, αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western της υποψήφιας διδάκτορος Καρρά Αικατερίνης, για τα πρωτεϊνικά επίπεδα απο- και αντι- αποπτωτικών μορίων έπειτα από την επίδραση των ουσιών, υποδεικνύουν ότι τα παράγωγα αυτά του μπετουλινικού οξέος, ίσως φέρουν πιθανή αποπτωτική δράση σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Με βάση λοιπόν όλα τα παραπάνω, οι συγκεκριμένες ουσίες πιθανόν μπορούν να χαρακτηριστούν ως εν δυνάμει SEGRMs.

4.2 Παράγωγα του μποςβελλικού οξέος

Όπως παρουσιάζεται και στην ενότητα 3.2, παλαιότερα πειράματα της ομάδας του εργαστηρίου, υποδεικνύουν ότι οι ουσίες TFC 001, TFC 002, TFC 010, TFC 011, TFC 012 και TFC 013, παράγωγα του μποςβελλικού οξέος, προωθούν σε ένα αξιοσημείωτο ποσοστό τη μετατόπιση του GR από το κυτταρόπλασμα, όπου βρίσκεται σε ανενεργή μορφή, στον πυρήνα, συγκριτικά με τη συνθήκη αναφοράς (control), υποδηλώνοντας ότι οι συγκεκριμένες ουσίες προσδένονται και αλληλεπιδρούν με τον GR. Μέσω της δοκιμασίας λουσιφεράσης/β-γαλακτοσιδάσης, ελέγχθηκε εάν η παραπάνω πυρηνική μετατόπιση, που προωθείται από τις ουσίες, συνοδεύεται κι από ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων που υπόκεινται υπό των έλεγχο GREs, άρα αποτελούν στόχο του μηχανισμού της trans-ενεργοποίησης του GR. Όπως φανερώνουν τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμασίας, καμία από τις έξι αυτές ουσίες δεν επάγει τη μεταγραφική δραστικότητα του GR σε κύτταρα HEK293 και HeLa. Επιπλέον, οι ουσίες φαίνεται να παρουσιάζουν έναν ιστο-ειδικό τρόπο δράσης κατά την συγχορήγησή τους με την DEX, δεδομένου ότι σε κύτταρα HEK293 και HeLa παρατηρούνται διαφορές ως προς το ποια από τις έξι αυτές ουσίες σε συνδυασμό με DEX επιφέρει μείωση της μεταγραφικής δραστικότητας του GR, συγκριτικά με τη μείωση που επιφέρει από μόνη της η DEX. Πιο ειδικά σε κύτταρα HEK293 έντονη μείωση παρατηρείται παρουσία της ουσίας TFC 010 σε συνδυασμό με DEX, ενώ στα κύτταρα HeLa παρουσία των ουσιών TFC 012 και TFC 013 σε συνδυασμό με DEX. Η διαφοροποίηση αυτή πιθανότατα να οφείλεται στην παρουσία διαφορετικών συμπαραγόντων στο πρωτεϊνικό σύμπλοκο της μεταγραφής, το οποίο

δημιουργείται έπειτα από την πυρηνική μετατόπιση του GR. Το παραπάνω αποτέλεσμα, μη ενεργοποίησης της μεταγραφικής δραστηριότητας του GR από τις ουσίες, επιβεβαιώνεται κι από τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά western για τα πρωτεϊνικά επίπεδα της PEPCK, το γονίδιο της οποίας αποτελεί άμεσο μεταγραφικό στόχο του GR στο μηχανισμό της trans-ενεργοποίησης και παίζει καθοριστικό ρόλο στην πορεία της γλυκονεογένεσης. Δεν παρατηρήθηκε λοιπόν αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα του συγκεκριμένου μορίου, έπειτα από κατεργασία κυττάρων HeLa και HepG2 με τις προς μελέτη ουσίες.

Παρόλο που η πυρηνική μετατόπιση του GR που προωθείται από τις συγκεκριμένες ουσίες δεν καταλήγει σε μεταγραφή γονιδίων που βρίσκονται υπό τον έλεγχο GREs, παλαιότερα πειράματα από μέλη της ομάδας του εργαστηρίου φανερώνουν ότι ο ενεργοποιημένος από τις ουσίες αυτές GR μπορεί να καταστείλει τη φλεγμονή που επάγεται από τον παράγοντα TNF-α και μάλιστα η δράση αυτή περιορίζεται σε GR θετικά κύτταρα. Επιπλέον, αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western για τον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων απο- και αντι-αποπτωτικών μορίων έπειτα από την επίδραση των ουσιών σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές, υποδεικνύουν ότι τα παράγωγα αυτά του μπροσβελλικού οξέος ίσως φέρουν πιθανή αποπτωτική δράση, που όμως πάλι σχετίζεται με τον κυτταρικό τύπο. Με βάση λοιπόν όλα τα παραπάνω και λόγω του γεγονότος ότι η δράση των ουσιών οδήγησε στην ενεργοποίηση των trans-κατασταλτικών μηχανισμών του GR έναντι των trans-ενεργοποιητικών, οι συγκεκριμένες ουσίες ίσως να μπορούν να χαρακτηριστούν ως εν δυνάμει SEGRMs, με δράση εξαρτώμενη και από τον εκάστοτε κυτταρικό τύπο.

5. Βιβλιογραφία

Αρθρα

- 1) Cháirez-Ramírez MH, Moreno-Jiménez MR, González-Laredo RF, Gallegos-Infante JA, Rocha-Guzmán NE, (2016) Lupane-type triterpenes and their anti-cancer activities against most common malignant tumors: a review, *EXCLI Journal*, 15:758-771
- 2) Georgatza D., Gorgogietas V., Kylindri P., Charalambous M., Papadopoulou K., Hayes J., Psarra AM., The triterpene echinocystic acid and its 3-O-glucoside derivative are revealed as potent and selective glucocorticoid receptor agonists, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 79, 277–287
- 3) Gruver-Yates A., Cidlowski J. (2013) Tissue-Specific Actions of Glucocorticoids on Apoptosis: A Double-Edged Sword, *Cells*, 2, 202-223
- 4) Grzanka A., Misiolek M., Golusinski W., Jarzab J., (2011) Molecular mechanisms of glucocorticoids action: implications for treatment of rhinosinusitis and nasal polyposis, *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 268:247–253
- 5) Hwang J., Weiss R., (2014) Steroid-induced diabetes: a clinical and molecular approach to understanding and treatment, *Diabetes Metab Res Rev.*, 30(2): 96–102.
- 6) Kadmiel M., Cidlowski J. (2013) Glucocorticoid receptor signaling in health and disease, *Trends Pharmacol Sci.*, 34(9): 518–530
- 7) Kleiman A., Tuckermann J., Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: Lessons from conditional knockout mice, *Molecular and Cellular Endocrinology*
- 8) Laszczyk M. (2009) Pentacyclic Triterpenes of the Lupane, Oleanane and Ursane Group as Tools in Cancer Therapy, *Planta Med*, 75: 1549–1560
- 9) Lin K., Wang L. (2016) New dimension of glucocorticoids in cancer treatment, *Steroids*, 111, 84–88
- 10) Mitre-Aguilar I., Cabrera-Quintero A., Zentella-Dehesa A., (2015) Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids: implications for breast cancer, *Int J Clin Exp Pathol*, 8(1):1-10
- 11) Mullauer F., Kessler J., Medema JP, (2009) Betulinic acid induces cytochrome c release and apoptosis in a Bax/Bak-independent, permeability transition pore dependent fashion, *Apoptosis*, 14:191–202
- 12) Oakley R., Cidlowski J., (2011) Cellular Processing of the Glucocorticoid Receptor Gene and Protein: New Mechanisms for Generating Tissue-specific Actions of Glucocorticoids, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Vol. 286, No. 5, pp. 3177–3184
- 13) Oakley R., Cidlowski J., (2013) The Biology of the Glucocorticoid Receptor: New Signaling Mechanisms in Health and Disease, *J Allergy Clin Immunol*, 132(5): 1033–1044
- 14) Ortsäter H., Sjöholm Å., Rafacho A., (2012) Regulation of Glucocorticoid Receptor Signaling and the Diabetogenic Effects of Glucocorticoid Excess
- 15) Patlolla J., Rao C. (2012) Triterpenoids for Cancer Prevention and Treatment: Current Status and Future Prospects, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13, 147-155
- 16) Poeckel D., Werz O., (2006) Boswellic Acids: Biological Actions and Molecular Targets, *Current Medicinal Chemistry*, 13, 3359-3369

- 17) Psarra AM, Sekeris K., (2008) Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: Regulatory molecules in a new environment, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1–11
- 18) Ríos J., Máñez S., (2017) New Pharmacological Opportunities for Betulinic Acid, *Planta Med*, 84: 8–19
- 19) Schlossmacher G., Stevens A., White A. (2011) Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells, *Journal of Endocrinology*, 211, 17–25
- 20) Sundahl N., Bridelance J., Libert C., De Bosscher K., Beck I. (2015) Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds, *Pharmacology & Therapeutics*, 152, 28–41
- 21) Syed Adnan Ali Shah, Huey Ling Tan, Sadia Sultan, Muhammad Afifi Bin Mohd Faridz, Mohamad Azlan Bin Mohd Shah, Sharifah Nurfazilah, Munawar Hussain (2014) Microbial-Catalyzed Biotransformation of Multifunctional Triterpenoids Derived from Phytonutrients, *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 12027-12060
- 22) Vandevyver S., Dejager L., Tuckermann J., Libert C., (2013) New Insights into the Anti-inflammatory Mechanisms of Glucocorticoids: An Emerging Role for Glucocorticoid-Receptor-Mediated Transactivation, *Endocrinology*, 154 (3) :993–1007
- 23) Wang M., (2005) The role of glucocorticoid action in the pathophysiology of the Metabolic Syndrome, *Nutrition & Metabolism*

Βιβλία

- 1) Guyton C., Hall J., (2008) *Ιατρική Φυσιολογία* (Μετάφρ. Ανωγειανάκης Γ., Ευαγγέλου Α., 11^η έκδοση), Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου
- 2) Wang Je-Chywan, Harris Charles, Glucocorticoid Signaling: From Molecules to Mice to Man, chapter 1, σελ. 16-17, chapter 5, σελ. 100, 109, 112-115

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, πλέον και το ταξίδι των μεταπτυχιακών σπουδών έφτασε στο τέλος του. Έτσι, λοιπόν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις συνεπιβλέπουσες καθηγήτρίες μου, Δρ. Παπαδοπούλου Καλλιόπη και Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία, για την ανάθεση του θέματος της διπλωματικής εργασίας και την ευκαιρία που μου έδωσαν να αποτελέσω μέλος των ερευνητικών τους ομάδων, για την εμπιστοσύνη, τις συμβουλές και τη νουθεσία, αλλά και την πολύ καλή επικοινωνία όλο αυτό το διάστημα της δουλειάς, με αποτέλεσμα την επιτυχή περάτωση των πειραμάτων. Ευχαριστώ, επίσης και τον Δρ. Λεωνίδα Δημήτριο που μου έκανε την τιμή να αποτελέσει μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής. Ωστόσο, η πορεία αυτή θα ήταν πολύ δύσκολη χωρίς καλούς συνεργάτες, γι' αυτό κι ευχαριστώ ιδιαίτερα και ξεχωριστά τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. Γκαραγκούνη Κωνσταντίνο, την υποψήφια διδάκτορα Καρρά Αικατερίνη, καθώς και κάθε μέλος των εργαστηρίων Βιοτεχνολογίας Φυτών και Περιβάλλοντος και Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, για την πολύ καλή συνεργασία και στήριξη αυτής της προσπάθειας κατά το εξάμηνο της διπλωματικής μου εργασίας. Ακόμη, εκ βάθους καρδιάς ευχαριστώ το Ίδρυμα Μποδοσάκη, που μου έκανε την τιμή να με επιλέξει μεταξύ άλλων υποψηφίων ως υπότροφό του για το ακαδημαϊκό έτος 2016-2017 και να καλύψει τα δίδακτρα του μεταπτυχιακού προγράμματος που παρακολούθησα. Ήταν μια σημαντική επιβράβευση της προσπάθειάς μου ως φοιτήτριας και η υποτροφία αυτή έπαιξε καταλυτικό ρόλο στη διεκπεραίωση του αυτού του κύκλου σπουδών. Η συνεργασία κι επικοινωνία με όλα τα στελέχη του Ιδρύματος ήταν εξαιρετική. Τέλος, θεωρώ ότι χωρίς τη στήριξη της οικογένειάς μου σε όλα τα επίπεδα, αλλά ιδίως στο επίπεδο της ψυχολογίας, η ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας θα ήταν αδύνατη. Τους ευχαριστώ λοιπόν, για την ανιδιοτελή στήριξη, εμπύχωση και κατανόηση σε όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.